

PREVENCIÓN DE UNA INFECCIÓN POR HIV-1 MEDIANTE LA INHIBICIÓN DE LA REORGANIZACIÓN Y/O LA ALTERACIÓN DEL CONTENIDO DE LOS DOMINIOS CON BALSAS DE LA MEMBRANA CELULAR, MEDIADAS POR Rho

5

### **PRIORIDAD**

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de EE.UU., serie 60/466.429, presentada el 30 de Abril de 2.003

### 10 **CAMPO TÉCNICO**

El presente invento se refiere en general a la prevención o retraso de una infección retroviral mediante la administración de agentes que previenen la agregación de receptores retrovirales asociada con los dominios con balsas (del inglés, "*raft domains*") de las membranas celulares. El presente invento se refiere más concretamente a la

15 prevención o tratamiento de una infección por HIV-1 mediante el uso de agentes que inhiben la activación de Rho-A actuando sobre la actividad de GTPasa o sobre la isoprenilación de proteínas. El presente invento se refiere también a la prevención o retraso de una infección por HIV-1 mediante el desplazamiento de los receptores para citoquinas de los dominios con balsas de las membranas celulares. Más en particular, el

20 presente invento se refiere al uso de inhibidores de la isoprenilación de proteínas en el tratamiento de una infección por HIV, tal como el HIV-1, y de infecciones retrovirales genéticamente relacionadas (y del síndrome de inmunodeficiencia adquirida resultante, SIDA).

### 25 **ANTECEDENTES**

La información que se proporciona a continuación no se admite que constituya la técnica anterior del presente invento, pero se proporciona para ayudar al lector a su comprensión.

La membrana plasmática es una estructura especializada que canaliza e

30 integra la información que fluye de manera continua entre una célula y su entorno. La membrana plasmática celular constituye también la primera barrera frente a una infección producida por patógenos intracelulares. De manera contraria a la consideración de la

-2-

membrana plasmática como una estructura fosfolipídica homogénea cargada con proteínas, la última década ha puesto de relieve la heterogeneidad de las fases que conforman la membrana plasmática. En particular, la evidencia acumulada indica que dominios lipídicos especializados, denominados balsas, desempeñan papeles  
5 fundamentales en la regulación de un conjunto de procesos celulares, que van desde la transducción de señales hasta las entradas de infecciones con patógenos intracelulares (Simons, K y Toomre, D (2000) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1.31-39; Brown, D. y London, E. (2000) J. Biol. Chem. 275, 17221-17224; Manes, S. y col. (2001) Semin. Immunol. 13, 147-157; Mellado, M. y col. (2001) Annu. Rev. Immunol. 19, 397-421). La evidencia  
10 actual apoya la idea de un papel principal de la estructura de los dominios con balsas en la regulación de las diferente interacciones entre los componentes de la membrana. Además, la evidencia apoya la idea de un papel para los dominios con balsas en la infectividad y propagación de patógenos, incluyendo de manera particular los virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Mañes, S. y col. (2003) Nat. Rev. Immunol. 3, 557-  
15 568).

La organización de los lípidos en una membrana está en gran medida determinada por la fase de la bicapa. Las diferentes fases de las membranas lipídicas representan estados físicos que difieren en el empaquetamiento, el grado de orden y la movilidad de los lípidos constituyentes (Brown, D. y London, E. (1998) J. Membr. Biol. 20 164, 101-114; Rietveld, A. y Simons, K. (1998) Biochim. Biophys. Acta 1376, 467-479; Brown, D. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 10517-10518. Las dos fases extremas son la fase líquido-cristalina de gel cuasi sólida ( $I_e$ ) y la fase líquida desordenada ( $I_d$ ). Las bicapas homogéneas formadas a partir de fosfolípidos o esfingolípidos purificados, exhiben una transición brusca, dependiente de la temperatura entre la fase de gel y la fase  
25 desordenada, que se produce a una temperatura de fusión característica ( $T_m$ ) (del inglés, "*melting temperature*"). Esta separación de fases en la membrana es consecuencia de la capacidad de empaquetamiento diferencial de los esfingolípidos y los fosfolípidos. Los esfingolípidos contienen largas cadenas de acilo enormemente saturadas, que confieren una  $T_m$  mucho más alta que las que poseen los glicerofosfolípidos, que son ricas en  
30 cadenas de acilo insaturadas y curvadas. Por lo tanto, las bicapas glicerolipídicas se encuentran en una fase  $I_d$  muy fluida y sus lípidos presentan una movilidad rotacional y una movilidad lateral altas. Por el contrario, las membranas enriquecidas con

-3-

esfingolípidos están muy ordenadas, teniendo sus lípidos densamente empaquetados y con una movilidad fuertemente reducida en el plano de la bicapa.

En presencia de colesterol, las bicapas lipídicas también pueden adoptar una tercera fase intermedia denominada fase líquida-ordenada ( $I_o$ ). Cuando está presente en una bicapa, el colesterol tiende a ocupar los espacios situados entre las cadenas hidrocarbonadas saturadas de los lípidos (Smaby, J. y col., (1996) *Biochemistry* 35, 5696-5704). Alineándose con los fosfolípidos y esfingolípidos, la presencia de colesterol en las membranas aumenta el orden de las cadenas hidrocarbonadas pero, lo que es más importante, disminuye la formación de las fases de gel (Bittman, R. (1997) *Subcell. Biochem.* 28, 145-171). Por consiguiente, la fase  $I_o$  se caracteriza por una sustancial movilidad lateral y rotacional de los lípidos. Estudios sobre modelos de membranas apoyan la idea de que las fases  $I_o$  e  $I_c$  podrían coexistir en las membranas biológicas. En estas bicapas artificiales, el colesterol se reparte preferencialmente con lípidos de alta  $T_m$  en el interior de los dominios de membranas  $I_o$ , mientras que se separa de los dominios de fase  $I_c$  enriquecidos en lípidos de baja  $T_m$  (Sanharam, M. y Thompson, T. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8686-8690; Ahmed, S. y col., (1997) *Biochemistry* 36, 10944-10953. De acuerdo con esto, en bicapas lipídicas complejas, tales como la membrana plasmática, se piensa que el colesterol se asocia con lípidos que contienen cadenas hidrocarbonadas saturadas en el interior de dominios con balsas de las membranas (Ge, M. y col. (1999) *Biophys. J.* 77, 925-933). Los dominios con balsas pueden por lo tanto definirse como membranas en la fase  $I_o$ , o en un estado con propiedades similares, resultantes del empaquetamiento lateral preferencial de lípidos de alta  $T_m$  y de colesterol en la hoja externa de la bicapa.

La hipótesis de las balsas expone que la separación de dominios discretos de fases líquidas-ordenadas y de fases líquidas desordenadas tienen lugar en membranas que contienen cantidades suficientes de esfingolípidos y esteroides, tales como la membrana celular plasmática. Aunque estudios realizados en membranas celulares apoyan este concepto, la existencia de balsas, sin embargo, no ha sido aún demostrada de manera concluyente en membranas celulares. No obstante, algunas estrategias sugieren con fuerza que las membranas celulares no contienen balsas. Estos métodos incluyen la insolubilidad en detergentes dependiente del contenido en colesterol y la co-localización de proteínas y lípidos agregados independientemente en parches sobre la superficie

- 4 -

celular (Brown, D. y London, E. *supra*), la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) entre proteínas ancladas a glicosilfosfatidil-inositol (GPI) (del inglés, "*GlycosylPhosphatidyl Inositol*") (Varma, R. y Mayor, S. (1998) *Nature* 394, 798-801; Kenworthy, A. y col., (2000) *Mot. Biol. Cell.* 11, 1645-1655), seguimiento de  
5 partículas individuales (Pralle, A. y col., (2000) *J. Cell. Biol.* 48, 997-1007), y microscopía de moléculas individuales (Schütz, G. Kada, G. Pastushenko, V. y Schindler, H. (2000) *EMBO J.* 19, 892-901). Las estimaciones del tamaño de las balsas varía desde unos cuantos nanómetros a micrómetros (Varma, R. y Mayor, S. *supra*; Kenworthy, A. y col., *supra*; Pralle, A. y col., *supra*; Schütz, G. y col., *supra*). Esto sugiere que las balsas  
10 de las células probablemente son más complejas que las de las membranas de los modelos.

Una estrategia bioquímica frecuentemente utilizada para identificar dominios con balsas en membranas celulares es la purificación de membranas resistentes a detergentes (DRM) en gradientes de densidad de flotación. Este método se basa en la  
15 insolubilidad relativa de las bicapas lipídicas de fase *Io* en detergentes no iónicos tales como Tritón X-100 a bajas temperaturas (Brown, D. y London E. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240, 1-7). Esta propiedad se ha demostrado en sistemas de membranas artificiales bifásicas *Io/Id*, en los que la insolubilidad en detergente se correlaciona con el contenido de la fase *Io* de la membrana (Dietrich, C. y col. (2001)  
20 *Biophys. J.* 80, 1417-1428). Estudios realizados en membranas artificiales indican también que algunos de los lípidos abundantes en las DRM, tales como el colesterol, en realidad se requieren para mantener y/o asociar los dominios *Io* (Dietrich, C. y col. *supra*). Además de su composición específica en lípidos, las DRM están enriquecidas en varias clases de proteínas (Simons, K. y Toomre, D.) (Fig. 1). Las proteínas ancladas a  
25 GPI constituyen una de las principales clases de proteínas asociadas a balsas, unidas a la hoja exoplásmica de la membrana plasmática a través de un resto de fosfatidil-inositol. Las cadenas de acilo y alquilo de GPI generalmente están saturadas de acuerdo con su afinidad por membranas *Io* y por asociaciones de balsas (Dietrich, C. y col. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10642-10647). Las proteínas citoplásmicas doblemente aciladas  
30 son otra clase importante de proteínas asociadas a DRM. Incluyen miembros específicos de la familia de las src-quinasas y determinados tipos de subunidades  $G\alpha$  de GTPasas heterotriméricas. Se piensa que estas proteínas se anclan a través de sus cadenas de acilo,

-5-

muy probablemente de ácido palmítico saturado (Resh, M. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 1451, 1-16; Liang, X. y col. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 30987-30994). Por el contrario, tanto las proteínas que se extienden por la membrana como las proteínas preniladas son difíciles de acomodar en un entorno ordenado. Realmente, las DRM tienen

5 una cantidad relativamente escasa de proteínas de transmembrana y contienen niveles muy bajos de proteínas preniladas (Melkonian, K. y col. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 3910-3917). No obstante, algunas proteínas de transmembrana están también enriquecidas en las DRM. La palmitoilación contribuye a que algunas proteínas de transmembrana se dirijan a las DRM (Melkonian, K. y col. (1999) *supra*), aunque no todas las proteínas de

10 transmembrana palmitoiladas se encuentran en DRM. Además, la secuencia del dominio de extensión por la membrana puede afectar al reparto de las DRM (Persch, A. y col. (1995) *J. Cell Sci.* 108, 1033-1041; Scheiffele, P. y col., (1997) *EMBO J.* 16, 5501-5508). Sin embargo, las mutaciones en dominios citoplásmicos puede también afectar a la asociación de proteínas de transmembrana con las DRM (Polyak, M. y col. (1998) *J.*

15 *Immunol.* 161, 3242-3248), incluso cuando las CYTOPLASMIC TAILS colas citoplásmicas probablemente no interaccionan directamente con la bicapa lipídica. Una posibilidad para explicar estas observaciones es que esos mutantes citoplásmicos no son capaces de interaccionar con sus parejas de unión, que dirigen y/o anclan las proteínas de transmembrana naturales en las balsas lipídicas (Brückner, K. y col. (1999) *Neuron* 22,

20 511-524; Oliferenko, S. y col., (1999) *J. Cell. Biol.* 146, 843-854; Machleidt, T. y col. (2000) *J. Cell. Biol.* 148, 17-28).

Las DRM representan agregaciones de membranas post-lisis y por lo tanto es difícil hacer comparaciones cuantitativas entre las DRM y las balsas naturales (London, E. y Brown, D. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1508 182-195). Como se ha

25 comentado anteriormente, se han utilizado nuevas estrategias técnicas diferentes para analizar la estructura y la dinámica de las balsas en células vivas y/o fijadas. El seguimiento de partículas individuales utilizando anticuerpos conjugados con oro coloidal demostró que el gangliósido GM1 y la proteína asociada a las balsas, Thy-1) estaban confinados transitoriamente a zonas del interior de la membrana plasmática

30 (Sheets, E. y col. (1997) *Biochemistry* 36, 12449-12458). Recientemente, la medida del movimiento lateral de moléculas individuales, ya sean lípidos (Schütz, G. y col., (2000) *EMBO J.* 19, 892-901) o proteínas (Pralle, A. (2000) *J. Cell Biol.* 48, 997-1007)

- 6 -

asociados o no a las balsas, demostró el confinamiento de marcadores específicos en membranas líquidas-ordenadas situadas en la superficie de células vivas. El reparto de las moléculas dentro y fuera de las balsas en estos estudios fue muy dinámico, pero por lo menos algunas proteínas de las balsas residieron en el interior de las balsas durante varios minutos.

Mientras que las zonas de confinamiento detectadas mediante seguimiento de moléculas individuales coinciden en experimentos independientes, los análisis de FRET de marcadores de balsas proporcionan por el contrario resultados controvertidos. En realidad, las medidas de proximidad entre proteínas ancladas a GPI indicaron en algunos casos que los marcadores asociados a balsas están concentrados en microdominios de la membrana plasmática de una manera sensible a colesterol (Varma, Y. y Mayor, S. (1998) *Nature* 394, 798-801; De Angelis, D. y col., (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 12312-12316). En otros estudios, sin embargo la FRET detectada entre proteínas ancladas a GPI y el glicosfingolípido GM1 se correlacionó con la densidad en superficie del marcador de balsas (Kenworthy, A. y col. (2000) *Mol. Biol. Cell* 11, 1645-1655), un hallazgo que no concuerda con la agregación en microdominios. Por lo tanto, aunque algunos marcadores de balsas podrían encontrarse en una proximidad de submicrómetros en la membrana, no están confinados en balsas estabilizadas. Las discrepancias no se han resuelto todavía.

Una estrategia ampliamente utilizada para TO PROBE la presencia de balsas en células vivas es la manipulación de los niveles de lípidos que forman las balsas. En algunos casos esta estrategia se utiliza como una "estrategia funcional" para demostrar la implicación de las balsas en una función celular particular. El agotamiento de colesterol es un método perfectamente documentado para romper la estructura de los dominios con balsas (Simons, K. y Toomre, D. (2000) *supra*). Fármacos de unión a esteroides, toxinas o detergentes son capaces de secuestrar al colesterol. Las ciclodextrinas se utilizan a menudo para rebajar los niveles de colesterol drásticamente o, si están formando un complejo con el colesterol, para introducir el colesterol en exceso en el interior de las membranas celulares (Keller, P. y Simons K. (1998) *J. Cell. Biol.*, 140, 1357-1367). De todas maneras, el tratamiento con ciclodextrinas debe realizarse por espacios cortos de tiempo ya que el fármaco afecta tanto a la membrana plasmática como a los orgánulos intracelulares conectados a ella cuando se aplican durante varias horas a

- 7 -

las células (Hansen, G y col., (2000) J. Biol. Chem. 275, 5136-5142; Grimmer, S. y col., (2000) Mol. Biol. Cell. 11, 4205-4216).

Rebajar los niveles de esfingolípidos en la membrana plasmática mediante tratamiento de las células con inhibidores de la biosíntesis de esfingolípidos o mediante su degradación con esfingolielinasa bacteriana, también rompe la asociación con DRM de varios marcadores de balsas (Scheiffele, P. y col., (1997) *supra*; Hanada, K. y col. (1995) J. Biol. Chem. 270, 6254-6260). De manera notable, las DRM pueden incluso formarse en ausencia de glicosfingolípidos. Esto se demostró utilizando una línea células deficiente en síntesis de glicosfingolípidos (Ostermeyer, A. y col., (1999) J. Biol. Chem. 274, 34459-34466). Es interesante destacar que estas células produjeron cantidades aumentadas de esfingomielina posiblemente para compensar la disminución de lípidos que prefieren las balsas o para mantener ordenados los dominios con balsas de las membranas. En conjunto, las alteraciones en el estado de los esfingolípidos de las células no son predecibles como sucede con el colesterol.

La evidencia anteriormente comentada dibuja la membrana plasmática como un equilibrio dinámico entre dominios en las fases ordenadas de balsas y en las fases desordenadas de no balsas. Sin embargo, el uso de detergentes distintos de Tritón X-100 ha sugerido que las células de mamífero pueden tener diferentes subtipos de balsas en la superficie. Esta intrigante posibilidad proviene de la observación originaria de Madore y colaboradores (Madore, N. y col. (1999) EMBO J. 18, 6917-6926) que mostraron que dos proteínas de las células neuronales, ancladas a glicofosfatidil-inositol, Thy-1 y una proteína príon, podía asignarse a membranas extraídas de modo diferente, con Tritón X-100 y con Brij 96. Asimismo, en células epiteliales se ha descrito la presencia de dos subtipos de balsas basándose en la insolubilidad diferencial en detergentes; las balsas insolubles en Lubrol (pero solubles en Tritón X-100) y las balsas insolubles en Tritón X-100 (Roper, K. y col. (2000) Nat. Cell. Biol. 2, 582-592). Aunque la integridad de los dos subtipos de balsas propuestas es dependiente de colesterol, por ahora se desconoce la dependencia potencial de distintas especies de esfingolípidos que tienen estos dominios.

Sin embargo, en los linfocitos T se han identificado dos subtipos diferentes de balsas basándose en la composición en glicosfingolípidos. Estudiando la polarización de células T inducida por un quimioatractor, Gómez-Mouton y

-8-

colaboradores (Gómez-Mounton, C. y col., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 9642-9647) encontraron que proteínas de membrana, tales como el receptor de quimioquina CXCR4 o el receptor de plasminógeno, se repartían de manera específica en balsas enriquecidas en GM3 mientras que otras proteínas, tales como las moléculas de adhesión intercelular ICAM-1 o CD44, se repartían mayoritariamente en balsas enriquecidas en GM1. Las balsas enriquecidas en GM1 y las balsas enriquecidas en GM3 son iguales de sensibles a la extracción de colesterol pero también igual de resistentes a la extracción con diferentes detergentes. Es importante indicar que las células usan la segregación de proteínas hacia diferentes subtipos de balsas para dirigir a proteínas específicas hacia localizaciones de la membrana espacialmente restringidas. En verdad, una alta densidad de balsas enriquecidas con proteínas-priones se encuentran en el cuerpo celular, mientras que las balsas que contienen Thy-1 se encuentran mayormente en las neuritas (Madore, N. y col., (1999) EMBO J. 18, 6917-6926); las balsas insolubles en lubrol, de células epiteliales, están asociadas selectivamente a las microvellosidades, pero permanecen separadas de las balsas planares, insolubles en Tritón (Roper, K. y col., (2000) Nat. Cell Biol., 2, 582-592); por último, las balsas enriquecidas en GM3 transportan proteínas específicas de membrana y proteínas de citoesqueleto hasta el borde conductor de linfocitos migratorios, mientras que las balsas basadas en GM1 portan receptores de adhesión célula-célula para el urópodo, en la parte posterior de células T.

Aunque se propuso que las balsas eran una señal de separación en la red del trans-Golgi para organizar las proteínas y lípidos en superficies celulares específicas de células epiteliales y neuronales polarizadas (Simons, K. y Toomre, D. (2000), supra; Rodriguez-Boulant, E. y Gonzalez, A. (1999) Trends Cell Biol. 9,291-294), se ha hecho de cada vez más evidente que las balsas lipídicas ejercen una influencia multifacetada sobre diferentes procesos celulares que incluyen la proliferación (Inokuchi, J. y col. (2000) Glycoconj. J. 17, 239-245), apoptosis (Grassme, H. y col., (2001) J. Biol. Chem. 276, 20589-20596), migración (Manes, S. y col., (1999) EMBO J., 18, 6211-6220; Khanna, K. y col., (2002) J. Clin. Invest., 109, 205-211), adhesión (Krauss, K. y Altevogt, P. (1999) J. Biol. Chem. 274, 36921-36927; Lacalle, R. y col., (2002) J. Cell Biol. 157, 277-289), e infección por patógenos (van der Goot, F. y Harder, T. (2002) Semin. Immunol. 13, 89-97), entre otros (para una revisión más general, véanse Simons, K. y Toomre, D. (2000) supra; Brown, D. y London, E. (2000) J. Biol. Chem. 275,



-9-

17221-17224; Mañes, S. y col., (2003) Nat. rev. Immunol. supra). Los dominios con balsas participan en estas acciones fisiológicas principalmente mediante la regulación espacial y temporal de las interacciones proteína-proteína requeridas para llevar a cabo estos procesos. Ciertamente, una importante característica general de las balsas parece  
5 que es la de estabilización de múltiples interacciones débiles que se producen después de un estímulo (Simons, K. y Toomre, D. (2000), supra). Esta propiedad, junto con la elevada movilidad de las unidades de las balsas en el plano de la membrana, puede facilitar la interacción (o aumentar la eficiencia) entre diferentes parejas de transducción de señales, como se ha revisado en lo que antecede, entre diferentes receptores celulares  
10 implicados en la entrada de patógenos o de toxinas.

Pueden contemplarse varias posibilidades en las que las balsas actúan como dispositivos que controlan las interacciones proteína-proteína en las membranas (Fig. 2). Considerando el tamaño más pequeño de las balsas, una determinada balsa puede contener solamente un número bajo de proteínas. Por lo tanto, una etapa  
15 importante en la iniciación de estos procesos es la capacidad de las pequeñas balsas individuales para agregarse en balsas más grandes. Este proceso de coalescencia lleva a los componentes de la maquinaria asociados en la balsa a otra plataforma de mayor tamaño, en donde puede tener lugar el encuentro entre dos proteínas anteriormente separadas en la balsa. Estas balsas más grandes pueden ser más estables que los dominios  
20 con balsas más pequeñas, las proteínas de la balsa pueden inducir la estabilización del citoesqueleto de actina subyacente (Oliferenko, S. (1999) J. Cell. Biol. 146, 843-854; Villalba, M. y col., (2001), J. Cell. Biol., 155, 331-338), lo cual podría además multiplicar las fuerzas de atracción y promover la asociación de complejos funcionales que inducirían una respuesta coordinada (Lacalle, R. y col. (2002) supra). Es importante  
25 señalar que las agregaciones de proteínas asociadas en las balsas permanecen separadas de las asociaciones de proteínas de membrana no asociadas a las balsas, cuando ambos tipos de proteína son inducidos artificialmente a que se junten (Harder, T. y col., (1998) J. Cell Biol., 141, 929-942). Por lo tanto, la segregación espacial de las proteínas del interior de membranas con diferente separación de las fase puede prevenir interacciones  
30 entre componentes de las balsas y componentes que no son de las balsas. Además, las proteínas asociadas a las balsas pueden separarse en diferentes subtipos de balsas que contienen grupos específicos de proteínas. Como se ha comentado anteriormente, la

-10-

coalescencia de las balsas parece tener lugar sólo entre el mismo subtipo de balsa. por lo tanto, las interacciones proteína-proteína en la membrana plasmática pueden controlarse no sólo mediante la separación espacial de los componentes entre balsas y no balsas, sino también mediante el reparto de cada componente en subtipos de balsas específicos.

5 Las balsas también pueden controlar interacciones entre proteínas secuestrando un elemento particular de la membrana, residiendo inicialmente en una región menos ordenada de la membrana, dentro de un dominio con balsas preexistente. Esto podría tener lugar arrastrando a una proteína hacia el interior de las balsas, mediante interacciones mediadas por proteínas, o cambiando su afinidad por las fases líquidas-ordenadas. La oligomerización es un factor bien documentado que aumenta la afinidad de 10 un componente de la membrana por las balsas (Harder, T. y col. (1998) J. Cell Biol. 141, 929-942). La monitorización de las balsas en células vivas sugiere que al menos algunos componentes de las balsas están en equilibrio dinámico con membranas sin balsas. Por consiguiente, para todo elemento de las balsas existe un coeficiente de reparto que 15 determina la fracción del marcador de las balsas que reside dentro o fuera de las balsas. El intercambio de componentes de las balsas con regiones circundantes sin balsas probablemente se restringiría a los límites entre los dominios de membrana. Al igual que la relación del área superficial con respecto a la circunferencia depende del tamaño de la balsa, las cinéticas de intercambio dependerán también del tamaño de la balsa. Por lo 20 tanto, la oligomerización de una proteína de membrana que tiene un intercambio alto entre regiones de membrana con balsas y sin balsas, puede estabilizar la asociación de estas proteínas dentro de dominios con balsas-ordenados de la membrana. De manera alternativa, las balsas pueden formarse *de novo* alrededor de proteínas de transmembrana oligomerizadas, una vez que son lo suficientemente estables para residir en estos 25 dominios ordenados.

La entrada de virus con cubierta puede dividirse en tres etapas: la unión del virus al receptor(es) de superficie celular específico, el cambio conformacional en la proteína de fusión viral, y la reacción de fusión propiamente dicha de las membranas celulares del virus y del hospedador. La proteína gp160 de la cubierta (Env) (del inglés, 30 "*Envelope*") del HIV-1 es una proteína integral de membrana de tipo I que media en la unión del virus y en la fusión de las membranas. Sintetizada en forma de un único precursor polipeptídico que forma trímeros, Env se escinde para generar dos subunidades

-11-

asociadas no covalentemente, gp120 y gp41. La subunidad gp120 se une al receptor principal de superficie celular, específico para HIV-1, CD4 (Maddon, P. y col. (1986) Cell 47, 333-348). Aunque la unión a CD4 es un prerequisite para la entrada del HIV-1, la unión del virus per se es insuficiente para mediar la infección viral. Se ha observado

5 que algunos miembros de la familia de receptores de quimioquinas actúan como co-receptores necesarios para la entrada del HIV-1 (Berger, E. y col., (1999) Annu. Rev. Immunol. 17, 657-700). La interacción inicial con CD4 promueve cambios conformacionales en gp120, lo cual da lugar a regiones críticas de la glicoproteína viral por interacción adicional con un miembro de la familia de receptores de quimioquinas.

10 Este segundo evento de unión conduce a la fusión de la membrana del hospedador y de la membrana viral mediante un proceso mediado por gp41 (Berger, E. y col., (1999) Annu. Rev. Immunol., 17, 657-700; Doms, R. y Trono, D. (2000) Genes Dev. 14, 2677-2688). La utilización de los receptores de quimioquinas varía dependiendo de la cepa viral y es el determinante principal del tropismo viral. Las cepas más principales de HIV-1 usan el

15 receptor CCR5 de quimioquinas junto con el receptor CD4 para la entrada del virus (denominadas cepas R5 del virus). En algunos individuos, los virus evolucionan de manera que usan un receptor relacionado, CXCR4, ya sea en lugar del receptor CCR5 (cepas X4 del virus) o además del receptor CCR5 (cepas R5X4).

Aunque el descubrimiento de los receptores de quimioquinas como

20 receptores esenciales para la entrada del HIV ha proporcionado un gran poder explicativo para el entendimiento del tropismo y de la patogénesis virales, todavía faltan algunas piezas cruciales del puzzle. Ciertamente, algunas moléculas de superficie celular modulan la susceptibilidad a una infección por HIV-1, incluso aunque esas moléculas no interaccionen directamente con la Env viral. Por ejemplo, el entrecruzamiento de CD26,

25 CD28 o CD44 aumenta la permisividad de las células frente al HIV-1, mientras que CD38, disminuye la susceptibilidad a la infección (Callebaut, C. y col., (1993) Science 275, 2045-2050; Dukes, C. y col. (1995) J. Virol. 69, 4000-4005; Savarino, A. y col., (1999) FASEB J. 13, 2265-2276). Es posibles que estas moléculas modulen la entrada de HIV-1 de manera indirecta regulando la densidad de los receptores virales. Además, la

30 fusión entre la membrana viral y la membrana de las células hospedadoras es un proceso cooperativo que requiere la suma de múltiples complejos de co-receptores CD4-gp120. En la actualidad se estima que cuatro de cada seis receptores CCR5 (Kuhmann, S y col.,

-12-

(2000) J. Virol. 74, 71305-7015) multiplican las moléculas de CD4 (Layne S. y col., (1990) (Nature 346, 277-279), y que tres de cada seis trímeros de Env son necesarios para formar un poro de fusión. Parece por lo tanto, que la infección por HIV-1 depende de múltiples interacciones intermoleculares sobre la superficie celular; CD4 unido a gp120  
5 debe encontrar el co-receptor apropiado sobre la superficie celular y, por lo tanto, diferentes complejos de co-receptores CD4-gp120 deben agregarse para llevar a cabo la fusión de las membranas viral-celular. La consecuencia lógica es que moléculas de la superficie celular del hospedador o rutas de señalización que promueven o previenen estos eventos de agregaciones, impactarían en la tasa y en la eficiencia de la entrada del  
10 virus. En este sentido, la remodelación de actina mediada por GTPasas de Rho puede desempeñar un papel central en estos eventos de agregación. En verdad, la unión de HIV-1 a la superficie celular desencadena la activación específica de Rho-A, un evento crucial para la entrada del virus.

Informes recientes sugieren que los dominios de balsas pueden actuar  
15 como una estructura en la que tienen lugar estas asociaciones laterales. En primer lugar, estudios fisicoquímicos han demostrado la interacción directa de gp120 con glicosfingolípidos definidos (Harausa J. y col. (1991) Science, 253, 320-323; Yahi, N. y col. (1992) J. Virol. 66 4848-4854; Hammache, D. y col. (1998) J. Biol Chem, 273, 7967-7971; Hammache, D. y col., (1999) J. Virol. 73, 5244-5248), sugiriendo que  
20 algunas etapas de la entrada del virus tienen lugar en los dominios de balsas. Además, la inhibición de la síntesis de glicosfingolípidos (Hug, IP. y col. (2000) J. Virol. 74, 6377-6385) y los anticuerpos anti-glicosfingolípidos (Harouse, J. y col., (1991) Science 253, 320-323) previenen la infección *in vitro* por HIV-I, indicando que la interacción de gp120 con glicosfingolípidos es importante para la infección del virus. En segundo lugar, el  
25 tratamiento de las células con fármacos que secuestran el colesterol, y que rompen las membranas *lo*, inhibe la infección por HIV-I *in vitro* (Mañes, S. y col. (2000) EMBO Rep. 1, 190-196; Liao, Z. y col. (2001) AIDS Res. Hum. Retroviruses 17, 1009-1019) e *in vivo* (Khanna, K. y col. (2002) J. Clin. Invest. 109, 205-211), indicando que la  
30 dinámica de las balsas puede influir de modo espectacular sobre la eficiencia de la entrada del virus. En tercer lugar, el direccionamiento de CD4 hacia una fracción de membrana sin balsas impide la entrada de HIV-1, aunque este mutante de CD4 se une a

-13-

la Env viral con la misma afinidad que el CD4 de tipo salvaje (del Real, G. y col., (2002) J. Exp. Med., *supra*).

Esta evidencia indica con fuerza que la entrada del virus tiene lugar debido al reparto de receptores para HIV dentro de la misma fase de membrana. En este sentido, mientras que la asociación de CD4 con las balsas está perfectamente establecida (Xavier, R. y col., (1998) Immunity 8, 723-732), el reparto de receptores de quimioquinas en las balsas es un asunto a debatir. Se ha informado que los co-receptores CCR5 y CXCR4 de HIV-1 se co-purifican en la fracción de DRM después de la agregación de ligandos o de la inducida por gp120 (Manes, S. y col. (2001) Semin. Immunol. 13, 147-157; Gómez Mouton, C. y col., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 9642-9647; Manes, S. y col., (1999) EMBO J., 18, 6211-6220, Mañes S. y col (2000) EMBO Rep, 1, 190-196; Sorice, M. y col., (2001) FEBS Letters 506, 55-60). Además, CCR5 y CXCR4 señalan las balsas (Mellado M. y col., (2001) *supra*) y están constitutivamente asociadas con otras proteínas de las balsas tales como CD4 (Xiao, X. y col. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 7496-7501). De manera importante, la co-localización de CXCR4 con CD4 tiene lugar en el subtipo de balsa enriquecida con GM3 (Gómez-Mouton, C. y col., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 9642- 9647; Sorice, M y col. (2001) FEBS Letters 506, 55-60). Por último, la inhibición de la síntesis de glicoesfingolípidos reduce los niveles de CCR5 en la membrana celular (Hug, IP. y col. (2000) J. Virol. 74, 6377-6385), sugiriendo que la asociación temprana de CCR5 con las balsas es necesaria para el transporte correcto del receptor.

Aunque varias evidencias funcionales sugieren que el HIV-1 explota los dominios de membrana con balsas del hospedador como portales de entrada, el mecanismo exacto que subyace en este proceso está siendo sólo elucidado. Los dominios con balsas del hospedador pueden ser usados por el virus para regular espacial y temporalmente la interacción entre gp120, Cd4 y el co-receptor CXCR4 o CCR5 (Mañes, S. y col., EMBO Rep., 1, 190-196; del Real, G. y col., (2002) *supra*) (Fig. 3). Según este modelo, la unión del virus a CD4 en las balsas induce la difusión y la coalescencia laterales de los complejos gp120/CD4 con las balsas que contienen los co-receptores CXCR4 o CCR5, proceso conducido por el citoesqueleto de actina. La evidencia más importante que apoya este modelo es la incapacidad para obtener el co-receptor CD4-gp120 ni en células que expresan el mutante CD4 no en balsas, ni en células con el

-14-

colesterol agotado, en las que la difusión lateral de las balsas está gravemente alterada. De manera adicional, algunos lípidos que están enriquecidos en las balsas pueden ser necesarios para poner en marcha las asociaciones supramoleculares y cambios conformacionales masivos en la Env viral requerida para la formación del complejo de fusión (Hug, IP. y col. (2000) J. Virol. 74, 6377-6385). Este modelo puede explicar la función de CD44 y CD28 en la co-estimulación del HIV, ya que la activación de estas moléculas asociadas a las balsas media en la reorganización de las balsas de lípidos en las células vivas (Oliferenko S. y col., (1999) J. Cell Biol. 146, 843-854; Viola, A. y col., (1999) Science 283, 680-682). Es importante destacar que otros virus tales como el virus Ébola, también usan las balsas de los hospedadores como portales de entrada (Bavari, S. y col. (2002) J. Exp. Med. 195, 593-602; revisiones en van der Goot, F. y Harder, T. (2001) Semin. Immunol. 13, 89-97). Es por lo tanto bastante tentador especular que la agregación de los dominios con balsas puede constituir un mecanismo bastante general para la entrada utilizada por distintos patógenos intracelulares.

Durante varios años, los virólogos han observado que la composición lipídica de las membranas de la cubierta de diversos virus, incluyendo algunos retrovirus, es distinta de la de la membrana plasmática del hospedador del que derivan, lo que sugiere que los virus se han ensamblado en microdominios de la membrana (Aloia, R y col. (1992), Vol. 6, Wiley-Liss, Nueva York). La cubierta del HIV, al igual que todas las membranas biológicas, está constituida por proteínas incrustadas en la bicapa lipídica. Esta bicapa presenta sin embargo una relación en moles de colesterol/fosfolípidos sorprendentemente elevada (>1,00). También hay un enriquecimiento en esfingolípidos en la membrana viral, pareciéndose por ello a la composición de los dominios de membrana con balsas (Aloia, R. y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5181-5185). Ya que los genes de las enzimas que metabolizan los lípidos no están presentes en el genoma de los retrovirus, la bicapa lipídica de la cubierta del HIV deriva necesariamente de la membrana lipídica de la célula hospedadora.

Observaciones recientes han proporcionado la evidencia adicional de que los viriones nuevos del HIV emergen de la célula hospedadora mientras envuelven los alrededores de los dominios con balsas (Nguyen, D. y Hildreth, J. (2000) J. Virol. 74, 3264-3272). La formación de viriones nuevos en las balsas de lípidos conduce a la exclusión de la CD-45-fosfatasa, abundante en membranas celulares, de la cubierta de

-15-

HIV-1, mientras que otras moléculas asociadas a las balsas, incluyendo las proteínas Thy-1 y CD59 de anclaje a GPI, las moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1, -2 y -3) (Gómez-Mouton C. y col., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 9642-9647), las integrinas LFA-1 y VL-4 (Brown, D. y London E. (2000) J- Biol. Chem. supra), y el gangliósido GM1, presentan niveles enriquecidos en la partícula viral. La incorporación de partículas del hospedador en la partícula viral puede tener varias consecuencias sobre la infección y la patogenicidad de los virus, desencadenando la activación de rutas de señalización en las células recién infectadas, tras la fusión de las membranas viral y celular (Fivaz, M y col. (1999) Trends Cell Biol. 9, 212-213; Liao, Z. y col., (2000) AIDS Res. Hum. Retrovir. 16, 355-366). La incorporación de otras glicoproteínas de la membrana de hospedador, tales como la clase II de HLA-DR, que suponen el 4,4% de la proteína total de la partícula viral, es utilizada probablemente por el virus para producir la desregulación de la respuesta inmune celular y humoral contra HIV-1 (Henderson, L. y col., (1987) J. Virol., 61, 629-632).

Además de la incorporación de proteínas del hospedador asociadas a las balsas, en la cubierta viral, se ha descrito el reparto de proteínas estructurales del HIV-I dentro de las membranas con balsas del hospedador, durante el ensamblaje de las nuevas partículas virales. En particular, las proteínas Gag y Env de HIV-1 se han detectado en dominios con balsas (Nguyen, D. y Hildreth, J. (2000) J. Virol. 74, 3264-3272; Rousso, I. y col. (2000) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 97, 13523-13525). La proteína Gag de HIV-1 se sintetiza en forma de una poliproteína precursora, Pr55Gag, que se compone de matriz (MA), cápside (CA), nucleocápside (CN) y dominios p6, así como de los péptidos espaciadores p2 y pI (Frankel, A y Young, J. (1998) Annu. Rev. Biochem. 67, 1-25). Se ha informado que la asociación de Pr55Gag se inicia con la unión del dominio MA a la membrana plasmática. Esta etapa de unión implica, directa o indirectamente, al menos varios dominios repartidos por toda la proteína MA. La especificidad de unión a la membrana plasmática la confiere el dominio M, que está constituido por una combinación de un resto N-terminal de miristoilo y por una agregación de residuos con carga positiva que actúan de manera sinérgica (Frankel, A. y Young, J. (1998) Annu. Rev. Biochem. 67, 1-25). La mutación del residuo N-terminal de Gly, que sirve como sitio de modificación del ácido mirístico, alteró la unión de Gag a la membrana y bloqueó el ensamblaje del virus (Freed, E. y col. (1994) J. Virol. 68, 5311-5320).

-16-

Aunque la acilación es una modificación frecuente en proteínas asociadas a las balsas, la miristoilación MA no es un factor importante para dirigir a la Pr55Gag hacia las balsas. Estudios realizados con mutantes de Pr55Gag sugieren que la asociación profusa de Gag con las balsas tiene lugar después de interacciones de Gag unida a membrana-Gag. El espaciador p2 y la Pr55Gag se requieren para la oligomerización de Gag (Accola, M. y col., (2000) J. Virol. 74, 5395-5402) y, por consiguiente, mutantes por delección de Pr55 Gag, que caren de p2, mostraron una asociación defectuosa a las balsas (Ono, A. y Freed, E. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 13925-13930). Es importante señalar que una porción de la proteína Gag total presente en las células infectadas, está presente en dominios densos similares a los dominios con balsas, denominados lanchas (del inglés, "*barges*") (Lindwasser, O y Rosh M. (2001) J. Virol., 75, 7913-7924). Las lanchas son probablemente el resultado de una agregación extensiva de Gag mediada por los dominios NC y p6. Se ha propuesto que los oligómeros de Gag pueden presentar una afinidad más fuerte por las balsas debido a un número aumentado de sitios de unión por complejo, o a una conformación alterada inducida por la interacción Gag-Gag. Los oligómeros de Gag pueden por otra parte estabilizar las agregaciones de balsas dando lugar a las grandes y densas estructuras de lanchas observadas.

La agregación de Pr55Gag induce la formación de una yema en la membrana y la posterior liberación de las partículas virales (Fig. 4). Durante la formación de la yema, las glicoproteínas de la Env viral se incorporan a las nuevas partículas virales, una función que también realiza el dominio MA de Pr55Gag. La cola citoplásmica de Env contiene dos residuos, que son dianas putativas para la modificación por palmitoilación. La retirada de estos aminoácidos parece no afectar ni a la expresión de la cubierta, ni al transporte de las proteínas, ni a la interacción Env-Gag (Yang, C. y col. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 9871-9875). Sin embargo, otros estudios han mostrado la acilación de Env, que se ha demostrado que es crítica para un direccionamiento eficiente hacia la membrana y para la formación de virus infecciosos. Por lo tanto, el dominio citoplásmico de gp160 dirige a la proteína de la cubierta hacia las balsas de lípidos, incluso en ausencia de Gag (Rousso, I. y col. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 13523-13525). Se destaca que las balsas están concentradas en los sitios de contacto célula-célula de las células T; por lo tanto, el direccionamiento de la



-17-

proteína Env hacia las balsas del hospedador puede facilitar la transmisión célula a célula del HIV-1

La evidencia sugiere que las balsas pueden estar implicadas en el ensamblaje y liberación del HIV-1. La importancia funcional de las balsas en la formación de las yemas de los viriones inmaduros de HIV-1 se destaca ya que el agotamiento del colesterol disminuye la producción de partículas de HIV-1 en las células infectadas (Ono, A. y Freed, E. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 13925-13930; Maziere. J. y col., (1994) Biomed. Pharmacother. 48, 63-63). Las balsas pueden actuar en este proceso como plataformas para la oligomerización de Gag en la membrana plasmática (Ono, A. y Freed, E. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 13925-13920; Lindwasser, O. y Rosh. M (2001) J. Virol. 75, 7913-7924), que a su vez reuniría la Env viral necesaria para formar nuevas partículas infecciosas. De manera adicional, la formación de las yemas virales puede depender de componentes específicos de las balsas del hospedador, tanto lípidos como proteínas, que regulan la liberación de los viriones (Vogt, V. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 12945-12947). Esto puede explicar el hecho de que el agotamiento de colesterol disminuye notablemente la producción de partículas de HIV-1, aunque este tratamiento no afecta a la síntesis de proteínas Gag o Env, ni a los procesamientos ni/o a la expresión en la superficie celular.

Además de las proteínas estructurales del HIV-1, la proteína reguladora Nef se asocia también con los dominios de balsas (Wang, J.-K. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 394-399). Este importante factor de virulencia en la patogénesis viral se ha informado que utiliza las balsas del hospedador para activar inmunológicamente a las células T, en relación con la activación a través de los receptores CD3 y CD28 (Wang, J.-K. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 394-399). Durante la infección, las células se activan y se polarizan, y las balsas, que normalmente están dispersas, tienden a coalescer junto con las proteínas unidas a GPI y con proteínas de señalización intracelular asociadas. La coalescencia de las balsas inducida por Nef concentra de esta manera a los mediadores de la activación de las células T, incluyendo Lck, Fyn y LAT (Lanzavecchia, A. y col. (1999) Cell 98, 1-4) y dando como resultado la iniciación de las cascadas de señalización, que promueve la secreción de IL-2 y la estimulación de la actividad transcripcional de HIV-1 (Doms, R. y Trono, D. (2000) Genes Dev. 14, 2677-2688).

-18-

En resumen, el HIV utiliza los dominios con balsas para concentrar las proteínas virales Env y Gag, que constituyen solamente una pequeña fracción de las proteínas totales de la célula hospedadora, en el interior de áreas relativamente pequeñas; esta etapa de concentración probablemente es crítica para otras interacciones proteína-proteína virales, conduciendo al ensamblaje, producción de yemas y maduración de las nuevas partículas virales. No obstante, las balsas del hospedador probablemente no se utilizan sólo como dispositivos de concentración, sino también para regular la actividad transcripcional del genoma viral. Además, el HIV no es capaz de ensamblarse ni de formar yemas correctamente en células murinas, lo que sugiere que estas células, o bien carecen de un factor celular necesario para la formación de las yemas, o bien contienen un factor que inhibe este proceso (Mariani, R. y col. (2000) J. Virol. 74, 3859-3970). No es prudente especular que un inductor o inhibidor de este tipo pueda confinarse o excluirse de manera selectiva de estos dominios con balsas.

Las quimioquinas son citoquinas quimiotácticas que son liberadas por una amplia variedad de células para atraer a macrófagos, células T, eosinófilos, basófilos y neutrófilos hacia sitios de inflamación (revisiones de Schall, (1991) Cytokine, 3, 165-183 y de Murphy, (1994) Rev. Immunol. 12, 593-633). Existen dos clases de quimioquinas, C-X-C(alfa) y C-C(beta), dependiendo de si las dos primeras cisteínas están separadas por un único aminoácido (C-X-C) o son adyacentes (C-C). Las alfa-quimioquinas, tales como la interleuquina-8 (IL-8), la proteína-2 activadora de neutrófilos (NAP-2) y la proteína de actividad estimuladora del crecimiento de melanomas (MGSA) son quimiotácticas principalmente para neutrófilos, mientras que las beta-quimioquinas, tales como RANTES, MIP-1alfa, MIP-1beta, la proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1), MCP-2, MCP-3 y la eotaxina son quimiotácticas para macrófagos, células T, eosinófilos y basófilos (Deng y col. (1996) Nature 381, 661-666).

Las quimioquinas se unen específicamente a receptores de superficie celular pertenecientes a la familia de siete proteínas de dominios de transmembrana, acopladas a proteína G (revisiones de Horuk, (1994) Trends Pharm. Sci., 15, 159-165) denominadas "receptores de quimioquinas". Al unirse a sus ligandos análogos, los receptores de quimioquinas transducen señales intracelulares a través de las proteínas G triméricas asociadas, produciendo un rápido aumento en la concentración de calcio

-19-

intracelular. Existen al menos dieciséis receptores de quimioquinas humanas que se unen a beta-quimioquinas o responden a ellas, con el siguiente patrón característico:

[illegible]

y el antígeno Duffy de grupos sanguíneos [RANTES, MCP-1] (Chaudhun, y col. (1994).

- 5 J. Biol Chem, 269, 7835-7838). Las  $\beta$ -quimioquinas incluyen eotaxina, MIP ("proteína inflamatoria de macrófagos", MCP ("proteína quimioattractora de monocitos" y RANTES (del inglés, "Regulation-upon-Activation, Normal T Expressed and Secreted")("regulación después de la activación, expresada y secretadas en células T normales").
- 10 El virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1), un retrovirus, es el agente etiológico de una enfermedad compleja que incluye la destrucción progresiva del sistema inmune (síndrome de inmunodeficiencia adquirida, SIDA) y de la degeneración del sistema nervioso central y periférico. Este virus en trabajos previos era conocido como LAV, HTLV-III o ARV.
- 15 A pesar del uso de las medidas profilácticas disponibles, la infección por HIV-1 constituye una pandemia en crecimiento, en particular en los países menos desarrollados, para la que falta un tratamiento adecuado. El régimen terapéutico más común, la terapia antirretroviral altamente activa (HAART) (del inglés, "Highly Active Antiretroviral Therapy") ha mejorado la calidad de vida de muchos individuos infectados
- 20 por HIV-1. Sin embargo es un tratamiento pesado, con grandes efectos secundarios, y puede dar como resultado la aparición de virus resistentes a fármacos.

-20-

Uno de los objetivos de la investigación sobre el HIV-1 consiste en comprender la interacción entre el virus y la célula hospedadora durante en ciclo replicativo del HIV, para bloquear las interacciones clave entre las proteínas virales y las del hospedador, y prevenir la propagación del virus sin los inconvenientes del HAART.

- 5 Los esfuerzos se han concentrado en los procesos de entrada y de gemación del HIV-1, que requieren la formación de grandes agregaciones entre proteínas virales y proteínas de la célula hospedadora (Mañes, S. y col (2003) Nat. Rev. Immunol. 3, 557-568). Los resultados sugieren que la entrada y salida del HIV-1 de la célula hospedadora requieren la reordenación del citoesqueleto de actina y unos niveles de colesterol adecuados en las
- 10 membranas del hospedador y en las membranas virales.

(Mañes, S. et al (2000) EMBO Rep. 1:190-196; Nguyen, D., and J. Hildreth. (2000) J. Virol.

(Mañes, S. et al (2000) EMBO Rep. 1:190-196; Nguyen, D., and J. Hildreth. (2000) J. Virol.

(Mañes, S. et al (2000) EMBO Rep. 1:190-196; Nguyen, D., and J. Hildreth. (2000) J. Virol.

(Mañes, S. et al (2000) EMBO Rep. 1:190-196; Nguyen, D., and J. Hildreth. (2000) J. Virol.

(Mañes, S. et al (2000) EMBO Rep. 1:190-196; Nguyen, D., and J. Hildreth. (2000) J. Virol.

(Mañes, S. et al (2000) EMBO Rep. 1:190-196; Nguyen, D., and J. Hildreth. (2000) J. Virol.

Aún no se ha encontrado un medio de ataque específico a estos factores del hospedador para evitar la propagación del HIV-1 con una toxicidad mínima.

- Se ha demostrado que algunos compuestos inhiben la replicación del HIV,
- 15 incluyendo la proteína CD4 soluble y sus derivados sintéticos (Smith y col. (1987) Science 238, 1704-1707), sulfato de dextrano, colorantes tales como el Amarillo Directo 50, Azul de Evans y determinados azocolorantes (Patente de EE.UU. n.º 5.468.469). Alguno de estos agentes antivirales se ha visto que actúan bloqueando la unión de gp120, la proteína de cubierta del HIV a su diana, a la glicoproteína CD4 de la célula.

- 20 La entrada de HIV-1 en la célula diana requiere al receptor CD4 de superficie celular y cofactores adicionales de la célula hospedadora. La fusina se ha identificado como un cofactor requerido para la infección con un virus adaptado a crecer con células C transformadas, aunque la fusina no promueve la entrada de virus macrofagotrópicos que se cree que son las cepas patógenas clave del HIV *in vivo*.
- 25 Recientemente se ha reconocido que para su entrada eficiente en las células diana, el virus de la inmunodeficiencia humana requiere un receptor de quimioquinas, muy

-21-

probablemente CCR-5 o CXCR4, así como el receptor principal CD4 (Levy, N.(14 de Noviembre de 1966) Engl. J. Med. 335(20), 1528-1530). El cofactor principal para la entrada mediada por las glicoproteínas de la cubierta de las principales cepas macrofagotrópicas de HIV-1 es CCR5, un receptor para las  $\beta$ -quimioquinas RANTES, MIP-1alfa y MIP-1beta (Deng, y col (1996) Nature, 381, 661-666). El HIV se une a la molécula CD4 sobre las células a través de una región de su proteína de cubierta gp120. Se piensa que el sitio de unión a CD4 en la gp120 del HIV interacciona con la molécula de CD4 dispuesta sobre la superficie celular y experimenta cambios conformacionales que la permiten unirse a otro receptor de superficie celular, tal como CCR5 y/o CXCR-4.

10 Esto lleva a la cubierta viral más cerca de la superficie celular y permite la interacción entre la gp41 dispuesta sobre la cubierta viral y un dominio de fusión dispuesto sobre la superficie celular, la fusión con la membrana celular y la entrada del núcleo del virus en la célula. Se ha demostrado que los ligandos de las beta-quimioquina evitan que el HIV-1 se fusione con la célula (Dragic, y col. (1996) Nature, 381, 667-673). También se ha

15 demostrado que un complejo de gp120 y CD4 soluble interacciona de manera específica con CCR-5 e inhibe la unión de los ligandos naturales de CCR-5, MIP-1alfa y MIP-1beta (Wu y col. (1996) Nature, 384, 179-183, Trkola y col. (1996) Nature, 384, 184-187).

Los seres humanos que son homocigotos para receptores CCR-5 mutantes que no sirven como co-receptores para el HIV-1 *in vitro*, se manifiestan inusualmente

20 resistentes a la infección por HIV-1 y no resultan inmunocomprometidos por la presencia de esta variante genética (Nature (1996) 382, 722-725). La ausencia de CCR-5 parece conferir una protección sustancial frente a una infección por HIV-1 (Nature (1996) 382, 668-669). Otros receptores de quimioquinas pueden ser usados por algunas cepas del HIV-1 o pueden ser favorecidos por vías de transmisión no sexuales. Aunque la mayoría

25 de las muestras clínicas aisladas de HIV-1 y estudiadas hasta la fecha utilizan CCR-5 o fusina, algunas pueden utilizar las dos así como los CCR-2B y CCR-3 relacionados, como co-receptores (Nature Medicine, (1996) 2(11), 1240-1243). No obstante, los fármacos que se dirigen a receptores de quimioquinas pueden no ser indebidamente comprometidos por la diversidad genética del HIV-1 (Zhang y col., (1996) Nature 383,

30 768). Por consiguiente, un agente que bloquee los receptores de quimioquinas en seres humanos que poseen receptores de quimioquinas normales, prevendrían la infección en individuos sanos y frenarían o pararían la progresión del virus en pacientes infectados.

-22-

Centrándose en la respuesta inmunocelular del hospedador frente a la infección por HIV, se proporcionarían tratamientos mejores para todos los subtipos de HIV. Estos resultados indican que la inhibición de los receptores de quimioquinas representa un método viable para la prevención o tratamiento de una infección por HIV y para la prevención o  
5 tratamiento del SIDA.

Se sabe que la eotaxina, RANTES, MIP-1alfa, MIP-1beta, MCP-1 y MCP-3 se unen a receptores de quimioquinas. Como se ha indicado anteriormente, los inhibidores de la replicación del HIV-1, presentes en sobrenadantes de células T CD8+, han sido caracterizados como las beta-quimioquinas RANTES, MIP-1alfa y MIP-1beta.

10 La mayor parte de la evidencia anteriormente resumida indica que la entrada del HIV requiere la participación activa de CD4, co-receptores, y otros posibles participantes tales como glicosfingolípidos, que a su vez pueden inducir la agregación de las balsas lipídicas en una manera dependiente del citoesqueleto de actina. Las Rho-GTPasas (una familia de 20 proteínas de mamíferos) son interruptores moleculares que  
15 controlan una amplia variedad de rutas eucariotas de transducción de señales. Se conocen principalmente por su papel central en la regulación del citoesqueleto de actina, pero su capacidad para influir sobre la polaridad celular, la dinámica de los microtúbulos, las rutas de transporte a través de membrana, y la actividad de factores de transcripción, puede ser igualmente importante. Las Rho-GTPasas controlan procesos celulares  
20 complejos creando ciclos entre un estado conformacional "activo" unido a GTP y un estado "inactivo" unido a GDP. La hidrólisis de GTP a GDP regula la interconversión. En el estado (GTP) activo "on" las GTPasas reconocen proteínas diana y generan una respuesta hasta que la hidrólisis de GTP vuelve al estado inactivo "off". La transducción de señales mediada por Rho-GTPasas es totalmente dependiente de la prenilación C-  
25 terminal. Las tres Rho-GTPasas principales (Rho, Rac, y Cdc42) son geranilgeraniladas postraduccionalmente, una reacción catalizada por la enzima geranil-transferasa. La isoprenilación de Rho-GTPasas permite la unión a membranas, la localización subcelular y el transporte intracelular de estas proteínas.

Debido a que la isoprenilación se requiere para su función, se ha propuesto  
30 que la Rho-GTPasas sean dianas de fármacos que previenen o reducen la síntesis de isoprenoides.

-23-

Las estatinas son inhibidores potentes de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzimaA (HMG-CoA)-reducataasa y se utilizan para tratar la hipercolesterolemia con escasos efectos secundarios. La HMG-CoA-reductasa es la enzima que transfiere la HMG-CoA al ácido L-mevalónico, la etapa limitante de la velocidad en la biosíntesis del colesterol. El ácido L-mevalónico es un precursor de la biosíntesis de colesterol y de la generación de isoprenoides que modifican postraduccionalmente proteínas celulares específicas. Inhibiendo la síntesis de ácido L-mevalónico, las estatinas también previenen la síntesis de otros intermediarios isoprenoides de la ruta biosintética del colesterol, que incluyen pirofosfato de farnesilo (FPP) y pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP). De hecho, las estatinas inducen cambios en el citoesqueleto de actina y en el ensamblaje de complejos de adhesión focales inhibiendo la isoprenilación de RhoA y RacI. Las Rho-GTPasas, que deben estar preniladas en su extremo C-terminal para que actúen, son interruptores moleculares que crean un ciclo entre los estados GTP-unido (activo) y GDP-unido (inactivo) para controlar la remodelación del citoesqueleto de actina en respuesta a estímulos (Etienne-Manneville, S. y A. Hall (2002) Nature 420, 629-635). Dirigiéndose a la HMG-CoA, las estatinas bloquean la síntesis de colesterol, pero también afectan al reordenamiento del citoesqueleto de actina inhibiendo las Rho-GTPasas (Koch, G. y col. (1997) J. Pharmacol. Exp. Ther. 283, 901-909).

Por consiguiente, se necesitan medios que inhiban la capacidad del HIV y de otros virus para explotar las estructuras de los dominios con balsas presentes en células humanas y de otros animales como medio para entrar en las células y propagar partículas virales adicionales.

Otros objetivos y ventajas resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción.

## SUMARIO DEL INVENTO

El presente invento proporciona composiciones farmacéuticas que inhiben la entrada del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) en células eucariotas. Un aspecto del presente invento proporciona composiciones farmacológicas que inhiben la producción de viriones del HIV en las células infectadas por HIV. Un aspecto del presente invento proporciona composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto

-24-

que reduce los depósitos celulares de intermediarios isoprenoides y/o inhibe la isoprenilación de proteínas y/o la actividad de la Rho-GTPasa.

En particular, el presente invento se refiere al uso de un inhibidor de la isoprenilación de proteínas o de una de sus sales, solvatos o derivados farmacéuticamente  
5 aceptables, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección por HIV, de una infección por un retrovirus genéticamente relacionado con el HIV, o del SIDA.

En otro aspecto, el presente invento abarca, el uso de un inhibidor de isoprenilación de proteínas o de una de sus sales o solvatos farmacéuticamente  
10 aceptables, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección por HIV, de una infección por un retrovirus genéticamente relacionado con el HIV, o del SIDA.

Se tendrá en cuenta que el inhibidor de la isoprenilación de proteínas puede ser un inhibidor de la geranilgeranilpifosfato-sintetasa, geranilgeranil-transferasa  
15 o un inhibidor de la activación de Rho. Por ello, los inhibidores preferidos son estatinas y sus análogos, que incluyen pero que no se limita a ellos, lovastatina, simvastatina, pravastatina, mevastatina, atorvastatina y fluvastatina.

Opcionalmente, el inhibidor de la isoprenilación de proteínas puede estar mezclado con un vehículo, aglutinante, agente de relleno, diluyente o excipiente  
20 farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización del invento, el inhibidor de la isoprenilación de proteínas se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos diferentes, seleccionados entre el grupo que comprende un inhibidor de la proteasa de HIV, un inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleosídico, un inhibidor de la transcriptasa  
25 inversa nucleosídico/nucleotídico, un antagonista de CCR5, un inhibidor de la integrasa, un inhibidor de RNasaH, un agente inhibidor de los dominios con balsas, un agente que disminuye los niveles de colesterol, un agente que disminuye la prenilación de proteínas, un inhibidor de la Rho-AGTPasa, y un agente que disminuye los niveles de glicoesfingolípidos.

30 Ejemplos de agentes que disminuyen los niveles de glicoesfingolípidos incluyen D-t-3',4'-etilendioxi-1-fenil-2-palmitoilamino-3-pirrolidino-1-propanol, D-t-4'-



-25-

hidroxi-1-fenil-2-palmitoilamino-3-pirrolidino-1-propanol, 1-fenil-2-palmitoilamino-3-pirrolidino-1-propanol, y sus sales y sus mezclas farmacéuticamente aceptables.

En una realización preferida el agente inhibidor de los dominios con balsas disocia los dominios con balsas. En otra realización preferida, el agente inhibidor  
5 de los dominios con balsas inhibe la formación de los dominios con balsas.

En una realización alternativa, el agente modulador de los receptores de quimioquinas inhibe la formación de los dominios de membrana con balsas y/o los disocia.

En otra realización más, el inhibidor de Rho-A GTPasa puede ser una  
10 estatina o uno de sus análogos, que incluyen, pero no se limitan a ellos, lovastatina, simvastatina, pravastatina, mevastatina, atorvastatina y fluvastatina.

Se apreciará que la combinación de uno o más de los agentes puede administrarse de modo independiente secuencial o simultáneo.

Se apreciará también que uno o más de los agentes puede ir mezclado con  
15 un vehículo, aglutinante, agente de relleno, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

En otro aspecto, el presente invento reside en un inhibidor de isoprenilación de proteínas o de una de sus sales, solvatos o derivados farmacéuticamente aceptables, para usar en el tratamiento de una infección por HIV, de una infección por un  
20 retrovirus genéticamente relacionado con el HIV, o del SIDA.

Otro aspecto más del presente invento proporciona una monoterapia para tratar un ser humano infectado con HIV administrando a dicho ser humano una composición que contiene una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto que disminuye los depósitos celulares de intermediarios isoprenoides y/o inhibe la  
25 isoprenilación de proteínas y/o inhibe la actividad de Rho-GTPasa.

En particular, el presente invento proporciona un método para tratar a un mamífero que padece una infección por HIV, una infección por un retrovirus genéticamente relacionado con el HIV, o SIDA, que comprende tratar a dicho mamífero con una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más agentes capaces de inhibir la  
30 isoprenilación de proteínas, o de una de sus sales, solvatos, o derivados farmacéuticamente aceptables.

-26-

El presente invento está dirigido a una terapia combinada que comprende administrar a un paciente que necesita dicha terapia una composición farmacológica que inhibe la entrada del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) en las células diana y tiene valor en la prevención de una infección por HIV, en el tratamiento de una infección por HIV, y en la prevención y/o tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) resultante. La composición del presente invento comprende además compuestos que disminuyen los niveles de isoprenoides celulares o que inhiben la isoprenilación de proteínas o que inhiben la actividad de Rho-A, compuestos que poseen actividad antiviral, moduladores de la actividad de los receptores de quimioquinas, agentes que disminuyen los niveles de glicosfingolípidos y agentes que disminuyen el nivel de colesterol. El presente invento se refiere también a composiciones farmacéuticas que contienen estos compuestos y a un método de uso de la presente composición para la prevención y tratamiento del SIDA y de una infección viral por HIV.

Un aspecto del presente invento proporciona que moduladores de la actividad de los receptores de quimioquinas son agentes que actúan de manera específica para romper la organización de los dominios con balsas. Esta rotura incluye acciones que inhiben la formación de balsas y acciones que disocian las balsas formadas con anterioridad.

Un aspecto del presente invento proporciona variantes mutantes sin balsas de receptores para HIV-1. Estos mutantes sin balsas son variantes de receptores para HIV, que se construyen por ingeniería genética, tales como CD4, CXCR4, CCR5, u otro receptor implicado en el proceso de infección por HIV.

Un aspecto del presente invento proporciona péptidos contruidos por ingeniería genética que tienen como objetivo los dominios con balsas e inhibe la fusión del virus HIV a la membrana.

Un aspecto del presente invento inhibe el direccionamiento del HIV hacia los dominios de balsas. Se proporcionan receptores mutantes para el HIV en los que la interacción de la unión virus-receptor tiene lugar con normalidad, pero el receptor unido al HIV no se agrega en los dominios de balsas. Debido a ello la dimerización del receptor, un prerequisite para la entrada del virus en la célula, no puede tener lugar.

-27-

Un aspecto del presente invento proporciona receptores mutantes sin balsas para el HIV, siendo dichos receptores mutantes CD4, CXCR4, CCR5, o cualquier otro receptor implicado en la entrada del HIV en las células.

5 Un aspecto del presente invento proporciona un método para tratar a un paciente que padece una infección por HIV, que comprende administrar al paciente una composición farmacéuticamente aceptable que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de un agente reductor de pirofosfato de geranil-geranilo u otros agentes que inhiben la geranilgeranilización de Rho-GTPasas.

10 Un aspecto del presente invento proporciona un método para tratar a un paciente que padece una infección por HIV, que comprende administrar al paciente una composición farmacéuticamente aceptable que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de un agente antiviral y un agente reductor de pirofosfato de geranil-geranilo u otros agentes que inhiben la geranilgeranilización de Rho-GTPasas.

15 Un aspecto del presente invento proporciona un método para tratar a un paciente que padece una infección por HIV, que comprende administrar al paciente una composición farmacéuticamente aceptable que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de un agente antiviral, una cantidad farmacéuticamente efectiva de un agente que disminuye la isoprenilación de proteínas, una cantidad farmacéuticamente efectiva de un modulador de la actividad de los receptores de  
20 quimioquinas, y una cantidad farmacéuticamente efectiva de un agente que disminuye los niveles de glicoesfingolípidos.

Un aspecto del presente invento proporciona un método para tratar a un paciente que padece una infección por HIV, que comprende administrar al paciente una composición farmacéuticamente aceptable que comprende una cantidad  
25 farmacéuticamente efectiva de un agente conocido que disminuye la isoprenilación de proteínas, una cantidad farmacéuticamente efectiva de un modulador de la actividad los receptores de quimioquinas, y una cantidad farmacéuticamente efectiva de un agente conocido que disminuye los niveles de glicoesfingolípidos.

30 Un aspecto del presente invento proporciona medios para tratar a un paciente que padece una infección producida por el virus Ébola, que comprende administrar a dicho paciente una composición farmacológica que inhibe la entrada del virus Ébola en las células diana y que tiene valor en la prevención de una infección

-28-

producida por el virus Ébola, el tratamiento de la infección producida por el virus Ébola, y la prevención y/o el tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida resultante. La composición del presente invento comprende además compuestos que poseen actividad antiviral, que son moduladores de la actividad de los receptores de quimioquinas, agentes que disminuyen los niveles de glicosfingolípidos y agentes que disminuyen la isoprenilación de proteínas. El presente invento se refiere también a composiciones farmacéuticas que contienen estos compuestos y a un método de uso de la presente composición para la prevención y tratamiento de una infección viral producida por el virus Ébola y de sus secuelas.

10

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Incluidas en los dibujos se encuentran las siguientes figuras:

La Figura 1 representa las balsas de las membranas, enriquecidas con GPI-proteínas, ancladas en la hoja externa de la bicapa, y enriquecidas en proteínas aciladas ancladas en la hoja interna.

15

La Figura 2 muestra balsas de la membrana a modo de dispositivos que controlan las interacciones proteína-proteína en la superficie celular.

La Figura 3 muestra las interacciones entre proteínas que permiten la entrada del HIV en las balsas.

20

La Figura 4 muestra el ensamblaje de partículas nuevas de HIV-1 que tiene lugar en las balsas.

La Figura 5 ilustra que las estatinas inhiben *in vitro* e *in vivo* la infección de PBMC humanas, producida por HIV-1. A, Infección de PBMC humanas activadas con PHA, no tratadas ( $\square$ ), tratadas con lovastatina ( $\square$ ), o tratadas con lovastatina + mevalonato ( $\square$ ), producida por cepas X4 o R5 del virus HIV-1. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SD de puntos triplicados ( $n=3$ ). B. PBMC aisladas de voluntarios humanos tratados con vehículo o tratados con pravastatina, se expusieron a dos dosis de la cepa BaL de HIV-1. Los datos corresponden al cociente entre los niveles de p24 antes del tratamiento y después del tratamiento, en PBMC procedentes de cada uno de los individuos, expresado en forma de porcentaje (\*\* $p<0,05$ ). C-D, Ratones SCID reconstituidos con PBMC humanas, se trataron con lovastatina durante dos semanas antes de la infección con HIV-1; se determinó la carga viral (C) y el cociente (D) CD4/CD5

30

-29-

humanos en cada uno de los animales una semana después de la infección. Se muestra uno de los dos experimentos representativos (\*\* $p < 0,05$ ). E. Ratones SCID tratados con lovastatina se reconstituyeron con PBMC teñidas con *CellTracker* y se estudió el marcaje de las células peritoneales a los tiempos indicados; los números muestran el porcentaje de las células marcadas.

La Figura 6 muestra que las Estatinas inhiben la entrada y la salida del HIV-1. A. Se realizaron infecciones de una sola ronda en células MT2-CCR5 no tratadas, tratadas con lovastatina y tratadas con lovastatina + mevalonato, utilizando un virus NL4-3 defectivo en la replicación y seudotipificado con las cubiertas de HIV-1<sub>Ada</sub> o VSV-G. La infección de las células se normalizó usando las células no tratadas como 100%. B. La producción de virus se midió mediante titulación de las existencias de virus producidas en células HEK-293T transfectadas con un virus NL4-3, defectivo en la replicación igual que en el apartado A), no tratadas, tratadas con lovastatina y tratadas con lovastatina + mevalonato. Las RLU se calcularon después de la normalización con la actividad de luciferasa procedente de extractos de las células producidas en las existencias. C. Se analizó la expresión génica dirigida por LTR en células de Jurkat transfectadas con pLTR-luc, pcDNA-tat y renilla sin promotor para la normalización, no tratadas, tratadas con lovastatina y tratadas con lovastatina + mevalonato. Todos los datos corresponden a la media  $\pm$  SD de puntos duplicados ( $n=3$ ).

La Figura 7 ilustra que los efectos de las estatinas son revertidos por adición de GGPP. A. Se realizaron experimentos de una sola ronda infección utilizando el virus NL4-3 defectivo en la replicación igual que en la Figura 2A, en células MT2-CCR5 tratadas con lovastatina o con lovastatina más los compuestos indicados. La infección de las células se normalizó considerando las células no tratadas como el 100%. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SD de puntos duplicados ( $n=4$ ). B. Infecciones de una sola ronda realizadas con el virus HIV-1<sub>Ada</sub> seudotipificado, en células MT2-CCR5 tratadas con lovastatina, GGTI-286 (un inhibidor de la geranil-transferasa) o FTI-277 (un inhibidor de la farnesil-transferasa). Los valores de RLU son la media  $\pm$  SD de puntos duplicados ( $n=3$ ). C. Niveles de colesterol libre o esterificado en células MT2-CCR5 no tratadas, tratadas con lovastatina y tratadas con lovastatina + mevalonato. Se muestra uno de los dos experimentos representativos. D. Expresión génica dirigida por LTR en células MT2-CCR5 tratadas con lovastatina, lovastatina más los compuestos indicados, o

-30-

con GGTI-286 o FTI-277. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SD de puntos duplicados (n=3).

La Figura 8 muestra que las estatinas inhiben la asociación lateral de CD4 y CXCR4, inducida por gp120, previniendo la activación de Rho. A. Células PBMC no tratadas, tratadas con lovastatina y tratadas con lovastatina + mevalonato, se incubaron con gp120III<sub>B</sub> y fueron tratadas con un anticuerpo anti-gp120. Después de fijadas, las células se tiñeron con anti-CXCR4 y se analizaron por microscopía confocal. Dos células representativas se muestran para cada uno de los casos (n=25). Barra, 2  $\mu$ m. B. Células MT2-CCR5 privadas de suero, se incubaron con HIV-1 y los lisados celulares se ensayaron para determinar Rho o Rac. El valor de Rho o Rac total se analizó en paralelo en extractos celulares en crudo como un control de la carga de la proteína. Se muestra uno de los tres experimentos. C. Se determinó la Rho activa en células no tratadas, tratadas con lovastatina y tratadas con lovastatina + GGPP, igual que en el caso anterior. Las transferencias Western de tres experimentos independientes se cuantificaron por densitometría y los valores se normalizaron usando Rho en extractos celulares en crudo como control de la carga. Los puntos correspondientes a los datos se representan con respecto a los valores medios de las células no expuestas al virus (tiempo 0) para cada uno de los casos. D. Infecciones de una sola ronda de células MT2-CCR5 transfectadas con Rho de tipo salvaje o con Rho-N19 mutante utilizando un virus HIV-I<sub>Ada</sub> pseudotipificado y defectivo en la replicación. E. Células HeLa-CD4 transfectadas con Rac de tipo salvaje, Rho de tipo salvaje, Rac-N17 o Rho-N19, se mezclaron con células BSC40 que expresan gp160 de HIV, y se midieron los eventos de fusión celular. D, E, los datos corresponden a la media  $\pm$  SD de puntos duplicados (n=3).

## 25 DESCRIPCIÓN DETALLADA

El presente invento se refiere al uso de un inhibidor de la isoprenilación de proteínas o de una de sus sales, solvatos o derivados farmacéuticamente aceptables, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección por HIV, de una infección por un retrovirus genéticamente relacionado con el HIV, o del SIDA. El inhibidor de la isoprenilación de proteínas puede ser un inhibidor de la geranilgeranilpifosfato-sintetasa, geranilgeranil-transferasa o un inhibidor de la

-31-

activación de Rho. Este inhibidor puede ser una estatina o uno de sus análogos, tal como lovastatina, simvastatina, pravastatina, mevastatina, atorvastatina y fluvastatina.

El presente invento también se refiere a un tratamiento, que comprende administrar a un paciente que necesita ese tratamiento una composición farmacológica que inhibe la entrada del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) en las células diana y tiene valor en la prevención de una infección por HIV, en el tratamiento de una infección por HIV, y en la prevención y/o tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) resultante. La composición del presente invento comprende además compuestos que inhiben la isoprenilación de proteínas disminuyendo los depósitos celulares de isoprenoides, y/o previniendo la activación de Rho-GTPasas.

El presente invento se refiere a una terapia combinada que comprende administrar a un paciente que necesita dicha terapia una composición farmacológica que inhibe la entrada del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) en las células diana y tiene valor en la prevención de una infección por HIV, en el tratamiento de una infección por HIV, y en la prevención y/o tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) resultante. La composición del presente invento comprende además compuestos que poseen actividad antiviral (tales como los inhibidores de proteasa del HIV, inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleosídicos, inhibidores de la transcriptasa inversa nucleosídicos/nucleotídicos, antagonistas de CCR5), inhibidores de la integrasa, e inhibidores de RNasaH, que son moduladores de la actividad de los receptores de quimioquinas, agentes que disminuyen los niveles de glicosfingolípidos y agentes que disminuyen la isoprenilación de proteínas. El presente invento se refiere también a composiciones farmacéuticas que contienen estos compuestos y a un método de uso de la presente composición para la prevención y tratamiento del SIDA y de una infección viral por HIV. En la técnica se conocen terapias combinadas para la prevención o tratamiento de una infección por HIV. Por ejemplo, 1 Patente de EE.UU. 6.432.981 describe una terapia combinada que comprende un agente antiviral, un agente que disminuye el nivel de colesterol, y un modulador de la actividad de los receptores de la quimioquina.

El presente invento proporciona un avance en la técnica apuntando a la membrana celular y en concreto los dominios de balsas presentes en ella, para prevenir la entrada y/o la gemación de los viriones de HIV. El presente invento proporciona también un avance apuntando a la entrada y a la gemación del HIV, regulando la agregación de los

-32-

dominios de balsas. Una realización del presente invento proporciona una dosis efectiva de un compuesto farmacéuticamente aceptable que inhibe la síntesis de los esfingoglicolípidos. Una realización del presente invento proporciona una dosis efectiva de un inhibidor de la actividad de los receptores de quimioquinas. Una realización del presente invento proporciona una dosis efectiva de un compuesto que baja los niveles de colesterol. Una realización del presente invento proporciona una dosis efectiva de un inhibidor de la isoprenilación de proteínas. Una realización más del presente invento proporciona una dosis efectiva de un compuesto antiviral.

Agente inhibidor de receptores de quimioquinas. La utilidad de los compuestos según el presente invento como inhibidores de la actividad de receptores de quimioquinas puede demostrarse mediante la metodología conocida en la técnica, tal como el ensayo de unión a quimioquinas descrito por Van Riper y col., J. Exp. Med., 177, 851-856 (1993) que puede adaptarse fácilmente para medir la unión a CCR-5, y el ensayo de unión de CCR-3 se encuentra descrito por Daugherty y col. J. Exp. Med., 183, 2349-2354 (1996). Las líneas celulares encargadas de expresar el receptor de interés incluyen las que expresan el receptor en la naturaleza, tales como EOL-3 o THP-1, o una células construida por ingeniería genética para expresar un receptor recombinante, tal como una línea de células T linfoblásticas de Jurkat transfectada con CCR5.

La utilidad de los compuestos según el presente invento como inhibidores de la diseminación de la infección del HIV en las células puede demostrarse por medio de metodología conocida en la técnica, tal como el ensayo de cuantificación de HIV descrito por Nunberg y col., (1991) J. Virology, 65(9),4887-4892.

En particular, los moduladores de quimioquinas, y más en particular los moduladores de CCR5, se encuentran descritos en la Patente de EE.UU. 6.432.981. Otros moduladores de la actividad de receptores de quimioquinas se encuentran descritos en la Patente de EE.UU. 6.441.001.

Inhibidores de 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A-reductasa / agentes que disminuyen los niveles de colesterol e isoprenoides. Los fármacos estatinas (véase Keri y col., documento U.S. 6.444.452) actualmente son los fármacos más terapéuticamente efectivos para disminuir el nivel de LDL en el torrente sanguíneo de un paciente en riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular. Esta clase de fármacos incluye, *inter alia*, compactina, lovastatina, simvastatina, pravastatina, mevastatina, atorvastatina y



-33-

fluvastatina. Los mecanismos de acción de los fármacos estatinas se han elucidado con cierto detalle. Alteran la síntesis de colesterol y de otros esteroides en el hígado uniéndose competitivamente a la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A-reductasa (HMG-CoA-reductasa). La HMG-CoA-reductasa cataliza la conversión del HMG-CoA en ácido L-mevalónico, que es la etapa que determina la velocidad en la biosíntesis de colesterol. A consecuencia de ello, su inhibición conduce a una disminución en la velocidad de formación de colesterol en el hígado. Datos clínicos y experimentales recientes indican sin embargo que los beneficios globales del tratamiento con estatinas puede exceder sus propiedades de disminución de los niveles de colesterol. Estos efectos adicionales se basan en la capacidad de las estatinas para inhibir la síntesis de intermediarios isoprenoides en la ruta biosintética del colesterol. La célula utiliza estos intermediarios isoprenoides para la modificación postraducciona de diferentes proteínas celulares, que incluyen la GTPasas de tamaño pequeño de la superfamilia Rho y Ras. Por consiguiente, la inhibición de la HMG-CoA-reductasa mediada por estatinas conduce a una disminución tanto en la velocidad de formación del colesterol en el hígado, como en la isoprenilación de proteínas. Ya que el anclaje a membrana y la activación de las Rho-GTPasas es dependiente de una modificación producida por isoprenoides, las estatinas pueden también prevenir la función de la Rho-GTPasa.

La Pravastatina es el nombre medicinal común del compuesto químico, ácido [1S-[1alfa(beta\*.delta\*)2 alfa,6alfa,8beta(R\*)8alfa]]1,2,6,7,8,8a-hexahidrobeta,delta, 6-trihidroxi-2-metil-1-oxobutoxi)1-naftalén-heptanoico (Registro de CAS, n.º 81093-370). La Pravastatina exhibe una importante ventaja terapéutica sobre otras estatinas. Una cantidad farmacéuticamente efectiva de Pravastatina inhibe selectivamente la síntesis de colesterol en el hígado e intestino delgado pero conserva la síntesis de colesterol en las células periféricas sustancialmente no afectadas (Koga T. y col. (1990) Biochim. Biophys. Acta. 1045, 115-120). Esta selectividad parece ser debida, en parte, a la presencia de un grupo hidroxilo en la posición C-6 del núcleo de hexahidronaftaleno. La posición C-6 está ocupada por un átomo de hidrógeno en la compactina y por un grupo metilo en la lovastatina. La Pravastatina es menos capaz de pasar a través de las membranas lipófilas de las células periféricas que los otros congéneres más lipófilos (Serajuddin y col., (1991) J. Pharm. Sci., 80, 830-834). Esta movilidad limitada de la

-34-

pravastatina se piensa que es la responsable de su acción más localizada en hígado e intestino.

La composición farmacéutica del presente invento preferiblemente incluye al menos una estatina como agente que disminuye los niveles de colesterol y/o como inhibidor de la isoprenilación de proteínas y/o como inhibidor de la Rho-GTPasa. Sin embargo, el agente que disminuye/o que inhibe los niveles de colesterol, o de isoprenoides o de Rho-GTPasa de la composición farmacéutica del invento no se limita a una estatina.

Agentes antivirales. Se define que un agente antiviral es cualquier sustancia que inhibe la actividad biológica de una DNA-polimerasa viral, la transcripción del genoma viral, RNA-polimerasa, transcriptasa inversa, helicasa, primasa, integrasa, o que inhibe la traducción y la maduración de proteínas virales, la formación (desarrollo) de proteínas reguladoras virales, o de proteínas estructurales virales, y proteínas similares. También se incluyen en esta relación los inhibidores de proteasas virales. Preferiblemente, un agente antiviral inhibe la actividad, o actividades, biológica de retrovirus. Muy preferiblemente, el agente antiviral inhibe la actividad, o actividades, biológica del HIV. Ejemplos de agentes antivirales adecuados incluyen inhibidores de la proteasa de HIV, inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa, inhibidores nucleosídicos/nucleotídicos de la transcriptasa inversa, antagonistas de CCR5, inhibidores de integrasa e inhibidores de RNAsaH. En relación con su estructura química, los agentes antivirales conocidos son principalmente derivados de purina y pirimidina, nucleósidos y nucleótidos. El presente invento no está limitado a los agentes antivirales conocidos. El presente invento contempla el uso de otros agentes antivirales a medida que vayan siendo conocidos. Sin limitación, entre los nucleósido y nucleótidos antivirales se incluyen:

aciclovir: 9-[(2-hidroxietoxi)metil]-9H-guanina,  
valacyclovir: éster de L-valilo de aciclovir,  
penciclovir: 9-[4-hidroxi-3(hidroximetil)-but-1-il]guanina  
famciclovir: éster diacetílico de penciclovir,  
ganciclovir: 9-(1,3-dihidroxi-2-propoximetil)guanina,  
idoxiuridina: 2'-desoxi-5-yodouridinaa,  
floxuridina: 2'-desoxi-5-fluoridina,

-35-

sorivudina: 1beta-D-arabinofuranosil-E-5-(2-bromovinil)uracilo

trifluridina: 5-trifluorometil-2'-desoxiuridina,

vidarabina: 9beta-D-robefuranosiladenina,

zidovudina (AZT): 3'-azido-3'-desoxitimidina,

5 didanosina: 2',3'-didesoxisnosina

zalcitabina: 2', 3'-didesoxicitidina,

cytarabina: 4-amino-1-D-arabinofuranosilo-2(1H)-pirimi-dinona

didesoxiadenosina: 2',3'-didesoxiadenosina, y edoxudina:2'-desoxi-5-etiluridina.

Un agente antiviral puede utilizarse en forma de su sal de adición de ácido  
10 terapéuticamente útil, si su estructura química permite la preparación de una sal de adición de ácido. De manera similar, el agente antiviral puede utilizarse en forma de su sal terapéuticamente adecuada, p. ej., una sal de metal, una sal de amonio o sales formadas con bases orgánicas, cuando su estructura química es adecuada para la preparación de esas sales.

15 Derivados nucleosídicos o nucleotídicos adecuados como el agente antiviral del presente invento están descritos en la Patente de EE.UU. 6.456.851, de la que todos sus contenidos se incorporan aquí como referencia. Una realización preferida de la composición farmacéutica del presente invento comprende un nucleósido, preferiblemente zidovudina como agente antiviral.

20 Inhibidores de proteasas: La replicación del HIV implica la síntesis de una larga cadena polipeptídica que contiene muchas proteínas. Estos precursores de las proteínas, denominados Gag y Gag-Pol, deben ser escindidos por una proteasa específica de HIV en 9 puntos específicos con el fin de producir las proteínas funcionales. El precursor gag en su momento dará lugar a proteínas estructurales y el precursor pol dará  
25 lugar a enzimas tales como la transcriptasa inversa, integrasa y proteasa. La proteasa del HIV no se encuentra en células de mamíferos. La proteasa del HIV es una aspartil-proteasa y es única porque puede escindir entre fenilalanina y tirosina o prolina, reacción no catalizada por enzimas humanas. Los inhibidores específicos para la proteasa de HIV bloquean la escisión de Gag y Pol, interfiriendo de este modo con la producción de  
30 nuevas partículas virales. Cualquier inhibidor de la proteasa de HIV, farmacológicamente aceptable, es adecuado para el presente invento.

-36-

Derivados de piridiminona y piridinona. Se sabe que algunos derivados de pirimidinona y piridinona inhiben la transcriptasa inversa de HIV. En concreto, los derivados de 1-[(2-hidroxietoxi)metil]-6-(feniltio)timina (HEPT) son muy conocidos por sus propiedades inhibitorias de la transcriptasa inversa del HIVI. La solicitud de Patente europea, documento EP-O 462 800 (Merck and Company Inc.) describe piridinonas sustituidas en la posición 3 con un grupo arilo o un grupo heterocíclico, unido al anillo de piridinona a través de una cadena. Dolle y col. describen 4-aril-tio-piridinonas (1995, J. Med. Chem. 38, 4679-4686), y en la correspondiente solicitud de Patente PCT, documento WO 97/05 113). Bisagni (documento U.S. 6.451.822) describe derivados de 3-(amino- o aminoalquil) pirodinona que también inhiben la transcriptasa inversa del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV). Estos derivados de pirimidinona y piridinona son adecuados, pero sin que se esté limitado a ellos, como el agente antiviral de la composición farmacéutica del presente invento.

Agente que disminuye los niveles de glicosfingolípidos. Un agente que disminuye los niveles de glicosfingolípidos es cualquier compuesto cuya acción biológica da como resultado cantidades más bajas de glicosfingolípidos celulares. Cientos de glicosfingolípidos (GSL) derivan de la glucosilceramida (GlcCer), que se forma mediante reacción enzimática a partir de ceramida y UDP-glucosa. La enzima implicada en la formación de GlcCer es la UDP-glucosa:N-acilesfingosina glucosiltransferasa (GlcCer-sintetasa). La velocidad de formación de GlcCer en condiciones fisiológicas puede depender del nivel de UDP-glucosa del tejido, que a su vez depende del nivel de glucosa en un tejido particular (Zador, I. Z. y col. (1993), J. Clin. Invest. 91, 797-803). Ensayos *in vitro* basados en la ceramida endógena producen velocidades de síntesis más bajas que las mezclas que contienen ceramida añadida, lo que sugiere que los niveles de ceramida en los tejidos normalmente son también limitadores de la velocidad (Brekert, A. y col. (1972) Brain Res. 36, 183-193).

Se ha encontrado que el nivel de GSL controla diversas funciones celulares, tales como el crecimiento, diferenciación y adhesión entre células o entre células y proteínas de matrices, unión de microorganismos y virus a las células, incluyendo la unión del HIV, y metástasis de células tumorales. Además, el precursor de la GlcCer, la ceramida, puede producir diferenciación o inhibición del crecimiento celular (Bielawska, A. y col. (1992) FEBS Letters, 307, 211-214). Es probable que todos los

-37-

GSL experimenten una hidrólisis catabólica, por lo que cualquier bloqueo en la GlcCer-sintetasa conduciría en último término al agotamiento de los GSL y a cambios profundos en el funcionamiento de una célula u organismo. Un inhibidor de la GlcCer-sintetasa, el PDMP (1R-fenol-2R-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol), previamente identificado en forma del D-treo isómero (Inokuchi, J. y col., (1987) J. Lipid Res. 28, 565-571), se ha encontrado que produce diversos cambios químicos y fisiológicos en células y en animales (Radin, N.S. y col., (1993) *NeuroProtocols, A Companion to Methods in Neurosciences*, S.K. Fisher y col., Ed., (Academic Press, San Diego) 3, 145-155, y Radin, N.S. y col., (1993) *Advances in Lipid Research; Sphingolipids in Signaling*. Parte B., R.M. Bell y col., Ed (Academic Press, San Diego) 28:183-213). Se ha descubierto que compuestos con grupos acilo grasos de cadena más larga son sustancialmente más efectivos (Abe, A. y col., (1992) J. Biochem 111, 191-196).

Shayman y col. (Patente de EE.UU. 6.255.336) describen compuestos amino similares a la ceramida que inhiben la formación de glucosil-ceramida (GlcCer) inhibiendo la enzima GlcCer-sintetasa y disminuyendo de este modo el nivel de glicoesfingolípidos. En particular, describen el D-t-3',4'-etilendioxi-1-fenil-2-palmitoilamino-3-pirrolidino-1-propanol y el D-t-4'-hidroxi-1-fenil-2-palmitoilamino-3-pirrolidino-1-propanol y sus sales farmacéuticamente aceptables. Shayman y col., (Patente de EE.UU. 6.051.598) describe el uso de 1-fenil-2-palmitoilamino-3-pirrolidino-1-propanol y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Mutantes de receptores para HIV-1 presentes en dominios sin balsas. CD4, CXCR4 y CR5 son receptores que están implicados en la entrada del HIV en las células. Los receptores de tipo salvaje se incorporan en dominios con balsas. Una realización del presente invento proporciona receptores modificados, mutados de manera tal que conservan la actividad de unión al HIV, los receptores no se localizan en dominios con balsas y/o dichos receptores no promueven la agregación de las balsas. Estos mutantes se generan mediante mutación de los receptores naturales utilizando procedimientos estándar de ingeniería genética (*Molecular Cloning: A laboratory manual* (1989). J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. maniatitis, Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Como ejemplo, el CD4-LDL es un receptor artificial para HIV-1, localizado en dominios sin balsas, al que el virus se une con la misma afinidad que al

-38-

receptor CD4 natural. El receptor CD4-LDL no media en la entrada del HIV-1 en células CD4-negativas, y actúa como un receptor trampa en linfocitos CD4-positivos (del Real y col. (2002) J. Exp. Med. 196, 193-301). El receptor CD4-LDL se generó mediante clonación del dominio CD4 extracelular en el plásmido pcDNA3,1A digerido con

5 HindIII/KpnI (Invitrogen) por PCR utilizando 5'-GCCAAGCTTATGAACCGGGGAGTC-3' [SEQ ID NO: 1] y 5'-AGAGGTACCCATTGGCTGCACCGG-3' [SEQ ID NO: 2] para producir el pCD4ext. Los dominios de transmembrana y yuxtamembrana del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL-R) se rescataron del plásmido pLGFP-GT46 utilizando 5'-

10 GCAACGGTACCGCTCTGTCCATTG-3' [SEQ ID NO: 3] y 5'-CTACTCGAGGTTCTTAAGCCGCCA-3' [SEQ ID NO: 4], y se clonaron en el plásmido pCD4ext abierto con KpnI/EcoRI. Como consecuencia de ello, la quimera CD4-LDL contiene la secuencia de aminoácidos correspondiente al dominio extracelular del receptor CD4 natural, seguida de la secuencia sintética:

15 GTALSIVLPVLLVFLCLGVFLLWKNWRLKN [SEQ ID NO: 5]. La proteína artificial, pLGFP-GT46, contiene la secuencia señal de la lactasa-florizin-hidrolasa de conejo, la GFP, un sitio de consenso de N-glicosilación, el dominio de transmembrana del receptor LDL-humano generado por PCR [5'-CTGTACAAGCTTAACGGATCCAAGCTTCAGCGGCCGCACCAAGCTCTGGGCG

20 A-3' [SEQ ID NO: 6] (cebador directo) y 5'-CTTGTACAGGTTCTTAAGCCGCCAGTTCTT-3' [SEQ ID NO: 7] (cebador inverso), y la cola citoplásmica de CD46 (Maisner y col. (1997)). La proteína cofactor de membrana (CD46) es una proteína basolateral que no está endocitosada.

Inhibidores de fusión dirigidos a las balsas. La fusión entre la membrana

25 del hospedador y la membrana del virus es el resultado de un cambio conformacional en la gp41 viral, que da como resultado la formación de una hélice enrollada en espiral. La formación de un paquete de seis hélices puede ser inhibida mediante la adición de péptidos tomando como base el dominio helicoidal carboxi-terminal de gp41. Esos péptidos se unen al enrollamiento en espiral de tres cadenas en el extremo amino terminal

30 de gp41, bloqueando la formación del paquete de seis hélices. Estos péptidos incluyen:

-39-

T-20 (YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF) [SEQ. ID. NO: 8]

DP-207 (MERDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF)  
[SEQ. ID. NO: 9],

DP-208 (LIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF) [SEQ. ID. NO: 10],

DP-209 (HSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF) [SEQ. ID. NO: 11],

DP-210 (LIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF) [SEQ. ID. NO: 12],

DP-211 (TSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF) [SEQ. ID. NO:  
13], and

DP-213 (LIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASL) [SEQ. ID. NO: 14]

(Wild et al. (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91: 9770-9774; Kilby et al. (1998) Nat. Med. 4:  
1302-1307).

Una realización del presente invento proporciona péptidos modificados basados en gp41 tales que se concentren en los dominios con balsas, introduciendo una secuencia de consenso unida a GPI en sus extremos C-terminales. El Solicitante en  
5 trabajos previos ha demostrado que el GPI orienta eficazmente a los péptidos de anclaje hacia la hoja externa de los dominios con balsas (del Real y col. (2002) J. Exp. Med. 196, 293-301). Como se muestra en la Figura 8A, la fusión del HIV-1 se impide con el péptido:

YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWFYDPRPSSGHSRYALIPPLAVIT  
YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL

10 resultante de la fusión de T20 y de la secuencia de unión unida a GPI, procedente del antígeno asociado a la función leucocitaria-3 (LFA-3; Seed, B. 1987. *An LFA-3 cDNA encodes a phospholipid-linked membrane protein homologous to its receptor CD2*. Nature 329, 840-842). La señal de consenso-GPI, derivada de LFA-3 es una secuencia de aminoácidos preferida del presente invento. Sin embargo, la señal-GPI de las quimeras  
15 del invento no se limita a LFA-3.

Inhibidores de proteasa dirigidos a las balsas. La proteasa activa de HIV-1 tiene una estructura homodimérica en la que las subunidades están conectadas por una interfase de lámina  $\beta$  formada por los segmentos de los aminoácidos N-terminal y C-

-40-

terminal. Péptidos cortos derivados de estos segmentos son capaces de inhibir la actividad de la proteasa. Estos péptidos incluyen:

: ISYEL [SEQ. ID. NO: 16], YEL [SEQ. ID. NO: 17].  
inhibit the protease activity. These peptides include ISYEL [SEQ. ID. NO: 16], YEL [SEQ. ID. NO: 17].  
inhibit the protease activity. These peptides include ISYEL [SEQ. ID. NO: 16], YEL [SEQ. ID. NO: 17].

Una realización del presente invento proporciona péptidos modificados derivados de la proteasa de HIV, de manera tal que dichos péptidos se concentren en los dominios con balsas, introduciendo una secuencia de consenso de doble palmitoilación en sus extremos N-terminales. Se ha observado que esta señal dirige a las proteínas citosólicas hacia la hoja interna de los dominios con balsas (Lacalle y col., (2002) J. Cell. Biol. 157, 277-289). Como se muestra en la Fig. 8B, la producción de partículas virales Luc-Ada está drásticamente disminuida en células que expresan el péptido MGCGCSSHPEDDISYEL [SEQ ID NO: 21], que corresponde a la fusión de los 12 aminoácidos procedentes del dominio único Lck y del péptido ISYEL [SEQ ID NO: 16] de la proteasa de HIV-1, utilizando técnicas convencionales de ingeniería genética. Asimismo, el procesamiento de Gag disminuye enormemente en células que expresan este péptido quimera. La señal de consenso de palmitoilación derivada de Lck es una secuencia de aminoácidos preferida del presente invento. No obstante, la señal de doble acilación de las quimeras del invento no se limitan a Lck.

La frase "farmacéuticamente aceptables" se utiliza aquí para hacer referencia a los compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance de un juicio médico ponderado, son adecuados para utilizar en contacto con tejidos de seres humanos y animales, sin que presenten una toxicidad, irritación o respuesta alérgica excesivas, u otro problema o complicación, compensados con una proporción razonable de beneficio/riesgo.

Según aquí se utiliza, la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" incluye las sales, solvatos o derivados farmacéuticamente aceptables (derivados entre los que se incluyen complejos, formas polimórficas, profármacos y compuestos marcados isotópicamente, así como sus sales, solvatos y sus sales solvatos), y sus isómeros, de los compuestos descritos.



-41-

En una realización más, los compuestos del invento incluyen estatinas y sus sales y solvatos farmacéuticamente aceptables. Debe entenderse que los compuestos del invento anteriormente mencionados incluyen sus formas polimórficas y sus isómeros.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos del invento  
5 incluyen sus sales de adición de ácido y sus sales básicas.

Las sales de adición de ácido adecuadas se forman a partir de ácidos que forman sales no tóxicas. Como ejemplos se incluyen las sales acetato, aspartato, benzoato, besilato, bicarbonato, bisulfato, borato, bromuro, camsilato, carbonato, cloruro, citrato, edisilato, esilato, formiato, fumarato, gluceptato, gloconato, glucoronato,  
10 hexafluorofosfato, hibenzato, hidrobromuro, hidrocloreuro, hidroyoduro, yoduro, isetionato, lactato, malato, maleato, malonato, mesilato, metilsulfato, naftilato, 2-napsilato, nicotinato, nitrato, orotato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/hidrógenofosfato/dihidrógenofosfato, sacarato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tosilato y trifluoroacetato.

Las sales básicas adecuadas se forman a partir de bases que forman sales no tóxicas. Como ejemplos se incluyen las sales de aluminio, arginina, benzatina, calcio, colina, dietilamina, diolamina, glicina, lisina, magnesio, meglumina, olamina, potasio, sodio, trometamina y zinc.  
15

También pueden formarse semisales de ácidos y bases, por ejemplo, las  
20 sales semisulfato y semicálcicas.

Para una revisión de sales adecuadas, véase *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, por Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2002).

Las sales farmacéuticamente aceptables del presente invento pueden prepararse a partir del compuesto de origen que contiene un resto básico o ácido, mediante  
25 métodos químicos convencionales. Generalmente, estas sales pueden prepararse haciendo reaccionar las formas de ácido libre o de base de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o del ácido apropiados, en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de ambos; generalmente se prefieren medios no acuosos como éter, acetato  
30 de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Las listas de sales adecuadas se encuentran en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17ª Edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, pág. 1418, cuya descripción se incorpora aquí como referencia.

-42-

La composición farmacéutica del invento puede administrarse en forma de productos cristalinos o amorfos. Estos productos pueden obtenerse, por ejemplo, en forma de rellenos sólidos, polvos, o películas, mediante métodos tales como precipitación, cristalización, liofilización, secado por pulverización o secado por evaporación. El secado por microondas o radiofrecuencia puede utilizarse para este fin.

Pueden administrarse solas o en combinación con uno o más de otros compuestos del invento, o en combinación con uno o más de otros fármacos (o en alguna de sus combinaciones). Generalmente, pueden administrarse como una formulación en asociación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptable. El término "excipientes" se usa aquí para describir cualquier componente distinto del compuesto(s) del invento. La elección del excipiente dependerá en gran medida de factores tales como el modo particular de administración, el efecto del excipiente sobre la solubilidad y estabilidad, y la naturaleza de la forma de dosificación.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el suministro de los compuestos del invento y los métodos para su preparación resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Estas composiciones y los métodos para su preparación pueden encontrarse, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19ª Edición, (Mack Publishing Company, 1995).

Los compuestos del invento pueden administrarse por vía oral. La administración oral puede implicar la deglución, de modo que el compuesto entra en el tracto gastrointestinal, o pueden utilizarse la administración bucal o sublingual mediante las cuales el compuesto entra en el torrente sanguíneo directamente desde la boca.

Las formulaciones adecuadas para administración oral incluyen formulaciones sólidas tales como comprimidos, cápsulas que contienen partículas, líquidos, o polvos, pastillas para chupar (incluyendo las rellenas de líquido) chicles, multipartículas y nanopartículas, geles, disoluciones sólidas, liposomas, películas (incluyendo mucoadhesivas), óvulos, pulverizadores y formulaciones líquidas.

Las formulaciones líquidas incluyen suspensiones, disoluciones, jarabes y elixires. Estas formulaciones pueden utilizarse como agentes de relleno en cápsulas duras o blandas y típicamente comprenden un excipiente, por ejemplo, agua, etanol, polietilenglicol, propilenglicol, metilcelulosa, o un aceite adecuado, y uno o más agentes emulsionantes y/o agentes favorecedores de la suspensión. Las formulaciones líquidas

-43-

también pueden prepararse mediante la reconstitución de un sólido, por ejemplo, de un sobre.

Los compuestos del invento también pueden utilizarse en formas de dosificación de disolución rápida y desintegración rápida tales como las descritas en

5 *Expert Opinion in Therapeutic Patents*, 11(6), 981-986, de Liang y Chen (2001).

Para las formas de dosificación en comprimidos, dependiendo de la dosis, el fármaco puede constituir desde el 1% en peso hasta 80% en peso de la forma de dosificación, más típicamente, desde 5% en peso hasta 60% en peso de la forma de dosificación. Además del fármaco, los comprimidos generalmente contienen un

10 disgregante. Ejemplos de disgregantes incluyen glicolato de sodio y almidón, carboximetilcelulosa sódica, carboximetilcelulosa cálcica, croscarmelosa sódica, crospovidona, polivinilpirrolidina, metilcelulosa, celulosa microcristalina, hidroxipropilcelulosa sustituida con un alquilo inferior, almidón, almidón pregelatinizado y alginato sódico. Generalmente, el disgregante comprenderá desde 1% en peso hasta

15 25% en peso, preferiblemente desde 5% en peso hasta 20% en peso de la forma de dosificación.

Los aglutinantes generalmente se utilizan para impartir cualidades cohesivas a una formulación de comprimidos. Aglutinantes adecuados incluyen celulosa microcristalina, gelatina, azúcares, polietilenglicol, gomas naturales y sintéticas,

20 polivinilpirrolidona, almidón pregelatinizado, hidroxipropilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa. Los comprimidos también pueden contener diluyentes, tales como lactosa (en forma monohidrato, monohidrato secada por pulverización, anhidra y formas similares), manitol, xilitol, dextrosa, sacarosa, sorbitol, celulosa microcristalina, almidón y fosfato cálcico dibásico dihidratado.

Los comprimidos también pueden incluir de manera opcional agentes tensioactivos, tales como laurilsulfato sódico y polisorbato 80, y deslizantes tales como dióxido de silicio y talco. Cuando están presentes, los agentes tensioactivos pueden constituir desde el 0,2% en peso hasta el 5% en peso del comprimido, y los deslizantes pueden constituir desde el 0,2% en peso hasta el 1% en peso del comprimido.

25

Los comprimidos contienen también lubricantes tales como estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de zinc, estearilfumarato sódico, y mezclas de estearato de magnesio con laurilsulfato sódico. Los lubricantes generalmente constituyen

30

- 44 -

desde el 0,25% en peso hasta el 10% en peso del comprimido, preferiblemente desde el 0,5% en peso hasta el 3% en peso del comprimido.

Otros componentes posibles incluyen antioxidantes, colorantes, saborizantes, conservantes, y agentes enmascaradores del sabor.

5 Las mezclas para la preparación de comprimidos pueden comprimirse directamente o por medio de rodillos para formar los comprimidos. Las mezclas para la preparación de comprimidos, o porciones de las mezclas, pueden de manera alternativa someterse a una granulación por vía húmeda, granulación por vía seca, o granulación de un material fundido, a una congelación de un material fundido, o a una extrusión, antes  
10 de la formación de los comprimidos. La formulación final puede comprender una o más capas y puede estar recubierta o no recubierta; puede incluso ir encapsulada.

La formulación de comprimidos se trata en "*Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Vol. 1*", de H. Lieberman y L. Lachman, Marcel Dekker, N.Y., N. Y. 1980 (ISBN 0-8247-6918-X)

15 Las formulaciones sólidas para administración oral pueden formularse para que sean de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen la liberación retardada, prolongada, pulsada, controlada, dirigida y programada.

Formulaciones de liberación modificada adecuadas para los fines del  
20 invento se encuentran escritas en la patente de EE.UU. n.º 6.106.864. Los detalles de otras tecnologías de liberación adecuadas tales como dispersiones de alta energía y partículas osmóticas y recubiertas se pueden encontrar en Verma y col., (2001) *Pharmaceutical Technology On-line*, 25(2), 1-14. El uso de goma de mascar para conseguir una liberación controlada se encuentra descrito en el documento WO  
25 00/35298.

Los compuestos del invento también pueden administrarse directamente al torrente circulatorio, al músculo, o a un órgano interno. Medios adecuados de administración parenteral incluyen las vías intravenosas, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intraesternal, intracraneal, intramuscular, y  
30 subcutánea. Los dispositivos adecuados para una administración parenteral incluyen inyectores de aguja (incluyendo microagujas), inyectores sin aguja y técnicas de infusión.

-45-

Las formulaciones parenterales son típicamente disoluciones acuosas que pueden contener excipientes tales como sales, carbohidratos y agentes tampón (preferiblemente a un pH de 3 a 9), pero en el caso de algunas aplicaciones, las disoluciones pueden formularse de modo más adecuado en forma de una disolución  
5 esterilizada no acuosa o en una forma seca para ser utilizada junto con un vehículo adecuado tal como agua esterilizada y libre de pirógenos.

La preparación de formulaciones parenterales en condiciones estériles, por ejemplo, por liofilización, puede llevarse a cabo fácilmente utilizando técnicas farmacéuticas estándar muy conocidas por los expertos en la técnica.

10 La solubilidad de los compuestos del invento utilizados en la preparación de disoluciones parenterales puede aumentarse mediante el uso de técnicas de formulación apropiadas, tales como la incorporación de agentes potenciadores de la solubilidad.

Las formulaciones para la administración parenteral pueden formularse  
15 para que sean de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen la liberación retardada, prolongada, pulsada, controlada, dirigida y programada. De este modo los compuestos del invento pueden administrarse en forma de un sólido, semisólido, o líquido tixotrópico para administración en una forma depot implantada que proporciona la liberación modificada del compuesto. Ejemplos de estas  
20 formulaciones incluyen los dispositivos revestidos de fármaco y las microesferas de PGLA.

Los compuestos del invento pueden también administrarse por vía tópica en la piel o mucosas, esto es por vía dérmica o transdérmica. Las formulaciones típicas para este fin incluyen geles, hidrogeles, lociones, disoluciones, cremas, ungüentos, polvos  
25 sueltos, vendajes, espumas, películas, parches dérmicos, láminas, implantes, esponjas, fibras, apósitos y microemulsiones. También pueden utilizarse liposomas. Los vehículos típicos incluyen alcohol, agua, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, glicerina, polietilenglicol y propilenglicol. Pueden incorporarse agentes potenciadores de la penetración, véase por ejemplo, J. Pharm. Sci, (Octubre 1999) 88(10), 955-958 de Finnin  
30 y Morgan.

-46-

Otros medios de administración tópica incluyen el suministro por electroporación, iontoforesis, fonoforesis, sonoforesis, y inyección con microagujas o sin agujas (p. ej., Powderject™, Bioject™, etc.)

Las formulaciones para administración tópica pueden formularse para que  
5 sean de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen la liberación retardada, prolongada, pulsada, controlada, dirigida y programada.

Los compuestos del invento también pueden administrarse por vía intranasal o mediante inhalación, típicamente en forma de un polvo seco (ya sea sólo, en  
10 forma de una mezcla, por ejemplo, en una mezcla seca con lactosa, o en forma de partículas de componentes mezclados, por ejemplo, mezclados con fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina) con un inhalador de polvo seco o en forma de aerosol con un recipiente presurizado, bomba, pulverizador, atomizador (preferiblemente un atomizador que utiliza compuestos electrodinámicos para producir una niebla fina), o un nebulizador,  
15 con o sin el uso de un propelente adecuado, tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano. Para uso intranasal, el polvo puede incluir un agente bioadhesivo, por ejemplo, quitosán o ciclodextrina.

El recipiente presurizado, bomba, pulverizador, atomizador o nebulizador, contiene una disolución o suspensión del compuesto que comprende, por ejemplo, etanol  
20 (opcionalmente, etanol acuoso) o un agente alternativo adecuado para dispersar, solubilizar, o prolongar la liberación del compuesto, el propelente(s) en forma de disolvente y un tensioactivo opcional, tal como trioleato de sorbitán, ácido oleico o un ácido oligoláctico.

Antes de su utilización en una formulación en forma de polvo seco o  
25 suspensión, el producto del fármaco se microniza hasta alcanzar un tamaño adecuado para su suministro por inhalación (típicamente menor que 5 micrómetros). Esto puede conseguirse mediante cualquier método de triturado apropiado, tal como molido de chorro espiral, molido de chorro en lecho fluido, procesamiento de fluidos supercríticos, para formar nanopartículas, una homogeneización a alta presión o secado por  
30 pulverización.

Las cápsulas (fabricadas, por ejemplo, con gelatina o HPMC), envases blíster y cartuchos para usar en un inhalador o insuflador, pueden formularse de manera

- 47 -

que contengan una mezcla pulverizada del compuesto del invento, una base pulverizada adecuada tal como lactosa o almidón y un modificador de la funcionalidad, tal como leucina, manitol o estearato de magnesio. La lactosa puede ser anhidra o estar en forma de monohidrato, preferiblemente esto último. Otros excipientes adecuados incluyen

5 dextrano, glucosa, maltosa, sorbitol, xilitol, fructosa, sacarosa y trealosa.

Una formulación de una disolución adecuada para usar en un atomizador utilizando compuestos electrodinámicos para producir una niebla fina puede contener desde 1 microgramo hasta 20 miligramos del compuesto del invento por dispensación, y el volumen de dispensación puede variar desde 1 microlitro hasta 100 microlitros. Una

10 formulación típica puede comprender un compuesto del invento, propilenglicol, agua esterilizada, etanol y cloruro sódico. Disolventes alternativos que pueden utilizarse en lugar del propilenglicol incluyen glicerol y polietilenglicol.

Aromatizantes adecuados tales como mentol y levomentol, o edulcorantes tales como sacarina o sacarina sódica, pueden añadirse a aquellas formulaciones del

15 invento destinadas a una administración inhalada/intranasal.

Las formulaciones destinadas a una administración inhalada/intranasal pueden formularse para que sean de liberación inmediata y/o modificada, usando, por ejemplo, ácido poli(DL)-láctico-co-glicólico (PGLA). Las formulaciones de liberación modificada incluyen la liberación retardada, prolongada, pulsada, controlada, dirigida y

20 programada.

En el caso de inhaladores de polvo seco y aerosoles, la unidad de dosificación se determina por medio de una válvula que libera una cantidad medida. Las unidades de acuerdo con el invento se distribuyen típicamente para administrar una unidad medida o "*puff*" que contiene desde 1 microgramo hasta 10 miligramos del

25 compuesto del invento. La dosis diaria total típicamente estará en el intervalo de 1 microgramo a 200 miligramos que pueden administrarse en una sola dosis o, más usualmente, en dosis divididas a lo largo del día.

Los compuestos abarcados por el invento pueden administrarse por vía rectal o vaginal, por ejemplo, en forma de supositorios, óvulos vaginales o enemas. La

30 manteca de cacao es una base tradicional para supositorios, pero pueden utilizarse distintas alternativas como apropiadas.

-48-

Las formulaciones destinadas a una administración rectal/vaginal pueden formularse para que sean de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen la liberación retardada, prolongada, pulsada, controlada, dirigida y programada.

5 Los compuestos incluidos en el invento también pueden administrarse directamente en ojo u oído, típicamente en forma de gotas de una suspensión micronizada o de una disolución en disolución salina isotónica, de pH ajustado y esterilizada. Otras formulaciones adecuadas para la administración ocular y aural incluyen ungüentos, implantes biodegradables (p. ej., esponjas de gel absorbibles, colágeno) e implantes no  
10 biodegradables (p. ej., silicona), láminas, lentillas y sistemas de partículas o vesículas, tales como niosomas o liposomas. Un polímero tal como poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), ácido hialurónico, un polímero celulósico, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, o metilcelulosa, o un polímero de heteropolisacáridos, por ejemplo, goma gelán, reticulados, puede incorporarse junto con  
15 un conservante tal como cloruro de benzalconio. Estas formulaciones también pueden suministrarse por iontoforesis.

Las formulaciones destinadas a una administración ocular/aural pueden formularse para que sean de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen la liberación retardada, prolongada, pulsada, controlada,  
20 dirigida y programada.

Los inhibidores de isoprenilación de proteínas del invento pueden mezclarse con entidades macromoleculares solubles, tales como ciclodextrina y sus derivados adecuados o polímeros que contienen polietilenglicol, con el fin de mejorar su solubilidad, velocidad de disolución, enmascaramiento del sabor, biodisponibilidad y/o  
25 estabilidad, para usar en los modos de administración anteriormente mencionados.

Los complejos de fármaco-ciclodextrina, por ejemplo, generalmente se encuentra que son útiles para la mayoría de las formas de dosificación y vías de administración. Pueden utilizarse complejos de inclusión y complejos de no inclusión. Como alternativa a una formación directa de complejos con el fármaco, la ciclodextrina  
30 puede utilizarse como aditivo auxiliar, es decir, como vehículo, diluyente, o solubilizante. Las ciclodextrinas más comúnmente utilizadas para estos fines son las ciclodextrinas  $\alpha$ ,



-49-

beta y gamma, de las que pueden encontrarse ejemplos en las solicitudes de Patente Internacional, documentos WO 91/11172, WO 94/02518 y WO 98/55148.

En la medida en que puede ser conveniente administrar un inhibidor de isoprenilación de proteínas en combinación con otro agente terapéutico, por ejemplo, con el fin de tratar una enfermedad o estado particular, está incluido en el alcance del presente invento que dos o más composiciones farmacéuticas, de las que al menos una contenga un inhibidor de isoprenilación de proteínas, puedan mezclarse convenientemente en forma de un *kit* adecuado para la coadministración de las composiciones.

Así, el *kit* del invento comprende dos o más composiciones farmacéuticas independientes, de las cuales al menos una contiene un inhibidor de isoprenilación de proteínas o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y medios para conservar dichas composiciones por separado, tales como un recipiente, un frasco con divisiones, o un empaquetamiento en lámina metálica con divisiones. Un ejemplo de un *kit* de este tipo es el envase blíster familiar utilizado para el envasado de comprimidos, cápsulas y formulaciones similares.

El *kit* del invento es particularmente adecuado para administrar formas de dosificación diferentes, por ejemplo, oral y parenteral, para administrar las composiciones individuales a intervalos de dosificación diferentes, o para titular las composiciones individuales una frente a otra. Para ayudar al cumplimiento terapéutico, el *kit* incluye típicamente pautas para la administración y puede ir provisto de una de las denominadas ayudas para la memoria.

Para la administración a pacientes humanos, que tienen un peso desde aproximadamente 65 kg hasta 70 kg, la dosis diaria total del inhibidor de isoprenilación de proteínas está típicamente en el intervalo de 1 mg a 10.000 mg, tal como una dosis de 10 mg a 1.000 mg, por ejemplo, de 25 mg a 500 mg, dependiendo por supuesto del modo de administración, de la edad, estado y peso del paciente, y estará en cualquier caso a criterio final del médico. La dosis diaria total puede administrarse en dosis únicas o divididas.

Por consiguiente, en otro aspecto el invento proporciona una composición farmacéutica que incluye un inhibidor de isoprenilación de proteínas o una de sus sales, solvatos o derivados farmacéuticamente aceptables, junto con uno o más excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

-50-

Los inhibidores de isoprenilación de proteínas y sus sales, solvatos y derivados farmacéuticamente aceptables, pueden administrarse solos o como parte de un tratamiento combinado. Por ello, incluidas en el alcance del invento existen realizaciones que comprenden la coadministración de composiciones que contiene, además de un compuesto del invento, uno o más agentes terapéuticos adicionales. Estos regímenes de múltiples fármacos, usualmente denominados tratamiento combinado, puede utilizarse en el tratamiento y prevención de una infección producida por el virus de la inmunodeficiencia humana, HIV. El uso de un tratamiento combinado de este tipo es especialmente pertinente en relación con el tratamiento y prevención de la infección y multiplicación del virus de la inmunodeficiencia humana, HIV, y de retrovirus patogénicos emparentados, en un paciente que necesita el tratamiento o en un paciente que está en riesgo de convertirse en ese paciente. La capacidad de esos patógenos retrovirales para evolucionar en un período de tiempo relativamente corto hacia cepas resistentes a cualquier monoterapia que haya sido administrada a dicho paciente es muy conocida en la literatura. Un tratamiento recomendado para el HIV es un tratamiento combinado de fármacos denominado Terapia retroviral sumamente activa, o HAART (del inglés, "*Highly Active Anti-Retroviral Therapy*"). La HAART mezcla tres o más fármacos contra HIV. Así, los métodos de tratamiento y las composiciones farmacéuticas del presente invento pueden utilizar un inhibidor de la isoprenilación de proteínas en forma de monoterapia, pero dichos métodos y composiciones pueden también utilizarse en forma de una terapia combinada en la que uno o más inhibidores de la isoprenilación de proteínas se coadministran en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales tales como los que aquí se describen con detalle en lo que antecede y en lo que viene a continuación.

En una realización más del invento, las combinaciones del presente invento incluyen el tratamiento con un inhibidor de isoprenilación de proteínas, o con una de sus sales, solvatos o derivados farmacéuticamente aceptables, y uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados entre los siguientes: inhibidores de la proteasa de HIV, que incluyen, pero no se limitan a ellos, indinavir, ritonavir, saquinavir, nelfinavir, lopinavir, amprenavir, atazanavir, tipranavir, AG1859 y TMV114; inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa (NNRTI) (del inglés, "*Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors*"), que incluyen, pero no se limitan a ellos, nevirapina,

-51-

delavirdina, capravirina, efavirenz, GW-8248, GW-5634 y TMC125; inhibidores nucleosídicos/nucleotídicos de la transcriptasa inversa que incluyen, pero no se limitan a ellos, zidovudina, didanosina, zalcitabina, estavudina, lamivudina, abacavir, adefovir, dipivoxil, tenofovir y emtricitabina; antagonistas de CCR5, que incluyen, pero no se limitan a ellos, N-{(1S)-3-[3-(3-isopropil-5-metil-4H-1,2,4-triazol-4-il)-exo-8-azabaciclo[3.2.1]oct-8-il]1-fenilpropil}-4,4,-difluorociclohexanocarboxamida o una de sus sales, solvatos o derivados farmacéuticamente aceptables, 1-endo-{8-[(3S)-3-(acetilamino)-3-(3-fluorofenil) propil]-8-azabaciclo[3.2.1]oct-3-il}-2-metil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazol[4,5-c]piridina-5-carboxilato de metilo o una de sus sales, solvatos o derivados farmacéuticamente aceptables; 1-endo-{8-[(3S)-3-(acetilamino)-3-(3-fluorofenil)propil]-8-azabaciclo[3.2.1]oct-3-il}-2-metil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-imidazol[4,5-c]piridina-5-carboxilato de etilo o una de sus sales, solvatos o derivados farmacéuticamente aceptables; Sch-D, ONO-4128, GW-873140, AMD-887 y CMPD-167; inhibidores de integrasa, que incluyen pero no se limitan a ellos, L-870.810; inhibidores de la entrada (p. ej., fusión), que incluyen pero no se limitan a ellos, enfuviritida; otros agentes que inhiben la interacción de gp120 con CD4, que incluyen pero no se limitan a ellos, BMS806 y BMS-488043; e inhibidores de la RNasaH.

También se incluyen en el alcance del presente invento, combinaciones de un inhibidor de isoprenilación de proteínas, o una de sus sales, solvatos, o derivados farmacéuticamente aceptables, junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales, seleccionados de manera independiente entre el grupo constituido por, p. ej., hidroxiurea; inmunomoduladores tales como factores de crecimiento estimuladores de colonias de granulocitos-macrófagos (p. ej., sargramostin), y distintas formas de interferón o de derivados de interferón; otros agonistas/antagonistas de receptores de quimioquinas, tales como antagonistas de CXCR4 (p. ej., AMD-070 y AMD-3100); moduladores de receptores de taquiquininas (p. ej., antagonistas de NK1) y distintas formas de interferón o de derivados de interferón; inhibidores de la transcripción viral y de la replicación del RNA viral; agentes que influyen, en particular regulan por disminución, la expresión de receptores CCR5; quimioquinas que inducen la internalización de receptores CCR5 tales como MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES y sus derivados; y otros agentes que inhiben infecciones virales o que mejoran el estado o la respuesta de individuos infectados por HIV a través de diferentes mecanismos.

-52-

Agentes que influyen (en concreto, regulan por disminución) la expresión de receptores CCR5 incluyen inmunosupresores tales como inhibidores de calcineurina (p. ej., tacrolimus y ciclosporín A); esteroides; agentes que interfieren con la producción o señalización de citoquinas, tales como inhibidores de las quinasas de Janus (JAK) (p. 5 ej., inhibidores de JAK-3, que incluyen 3-{(3R, 4R)-4-metil-3-[metil-(7H-pirrolo[2,3,-d]pirimidin-1-il)-3-oxo-propionitrilo] y sus sales solvatos o derivados farmacéuticamente aceptables; anticuerpos contra citoquinas (p. ej., anticuerpos que inhiben al receptor de la interleuquina-2 (IL-2), incluyendo basiliximab y daclizumab); y agentes que interfieren con la activación celular o con los ciclos celulares, tales como la rapamicina.

10 También están incluidas en el alcance del presente invento, combinaciones de un inhibidor de isoprenilación de proteínas, o una de sus sales, solvatos o derivados farmacéuticamente aceptables, junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales que frenan la velocidad del metabolismo de los compuestos del invento, produciendo con ello una exposición incrementada en los pacientes. Aumentar la exposición de esta manera se 15 conoce como reforzar. Esto tiene el beneficio de aumentar la eficacia del compuesto del invento o de disminuir la dosis requerida hasta alcanzar la misma eficacia que con una dosis sin reforzar. El metabolismo de los compuestos del invento incluye procesos oxidativos llevados a cabo por enzimas P450 (CYP450), concretamente CYP3A4, y conjugación por acción de UDP glucoronosil-transferasa y enzimas de sulfatación. Así, 20 entre los agentes que pueden utilizarse para aumenta la exposición de un paciente a un compuesto del presente invento se encuentran aquellos agentes capaces de actuar como inhibidores de la menos una de las isoformas de las enzimas del citocromo P450 (CYP459). Las isoformas de CYP450 que pueden ser inhibidas ventajosamente incluyen, pero no se limitan a ellas, CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 y CYP3A4. Los 25 agentes adecuados que pueden utilizarse para inhibir CYP3A4 incluyen, pero no se limitan a ellos, ritonavir, saquinavir o ketoconazol.

Un experto en la técnica apreciará que un tratamiento combinado de fármacos, según se ha descrito aquí en lo que antecede, puede comprender dos o más compuestos que tienen el mecanismo de acción igual o diferente. Así, sólo a modo de 30 ilustración, una combinación puede comprender un compuesto del invento y: uno o más NNRTI; uno o más NRTI y un PI; uno o más NRTI y un antagonista de CCR5; un PI; un PI y un NNRTI; y así sucesivamente.

-53-

Además del requerimiento de una eficacia terapéutica, que puede necesitar el uso de agentes terapéuticos además de los inhibidores de isoprenilación de proteínas, pueden existir razonamientos adicionales que empujen o recomienden enormemente el uso de una combinación de un compuesto del invento y de otro agente terapéutico, tal como en el tratamiento de enfermedades o estados que son resultado directo de la enfermedad o estado básico o subyacente, o que indirectamente lo acompañan. Por ejemplo, puede ser necesario, o al menos conveniente, tratar infecciones producida por el Virus de la Hepatitis C (HCV), Virus de la Hepatitis B (HBV), Papilomavirus Humano HPV), infecciones oportunistas (que incluyen infecciones bacterianas y fúngicas), neoplasmas y otros estados que se producen como resultado del estado inmunocomprometido del paciente que está siendo tratado. Otros agentes terapéuticos pueden utilizarse con los compuestos del invento, p. ej., con el fin de proporcionar inmunoestimulación o para tratar el dolor y la inflamación que acompañan la infección inicial y fundamental del HIV.

Por consiguiente, los agentes terapéuticos para utilizar en combinación con los compuestos de la fórmula (I) y con sus sales, solvatos o derivados farmacéuticamente aceptables, incluyen también interferones, interferones tratados con polietilenglicol (p. ej., peg-interferón alfa-2a y peg-interferón alfa-2b), lamivudina, ribavirina y emtricitabina, para el tratamiento de hepatitis; compuestos antifúngicos tales como fluconazol, itraconazol y voriconazol; compuestos antibacterianos tales como azitromicina y claritromicina; interferones, daunorrubicina, doxorubicina y paclitaxel para el tratamiento del sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA; y cidofovir, fomivirsen, foscarnet, ganciclovir y valcyte para el tratamiento de la retinitis producida por citomegalovirus (CMV).

Otras combinaciones para usar conforme al invento incluyen combinaciones de un inhibidor de isoprenilación de proteínas, o una de sus sales, solvatos o derivados farmacéuticamente aceptables, junto con antagonistas de CCR1, tales como BX-471; un agonista de  $\beta$ -adrenoceptores tal como salmeterol; un agonista de corticosteroides tal como propionato de fluticasona; un antagonista de LTD4 tal como montelukast; un antagonista muscarínico tal como bromuro de tiotropium; un inhibidor de PDE4 tal como colimilast o roflumilast; un inhibidor de COX-2, tal como celecoxib, valdecoxib o rofecoxib; un ligando de  $\alpha$ -2-delta tal como gabapentín o pregabalín; un

-54-

interferón beta tal como REBIF; un modulador de receptores de TNF tal como un inhibidor de TNF- $\alpha$  (p. ej., adalimumab), un inhibidor de la HMG-CoA-reductasa tal como una estatina (p. ej., atorvaestatina), o un inmunosupresor, tal como ciclosporina o un macrólido tal como tacrolimus.

5                   En las combinaciones anteriormente descritas, el inhibidor de isoprenilación de proteínas, o una de sus sales, solvatos o derivados farmacéuticamente aceptables, y otro agente(s) terapéutico, puede administrarse, con respecto a las formas de dosificación, o bien por separado o bien al mismo tiempo uno en relación con el otro, y con respecto a su tiempo de administración pueden administrarse simultáneamente o en  
10                   orden secuencial. Así, la administración de uno de los agentes componentes puede ser antes, al mismo tiempo, o después de la administración del otro agente(s) componente.

                  Por consiguiente, en un aspecto más el invento proporciona una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de isoprenilación de proteínas, o una de sus sales, solvatos o derivados farmacéuticamente aceptables, y uno o más agentes  
15                   terapéuticos adicionales.

                  Se tendrá en cuenta que todas las referencias aquí incluidas al tratamiento incluyen tratamiento curativo, paliativo y profiláctico.

                  La composición farmacéutica del invento puede ser también adecuada para terapia génica de células diana del HIV.

20                   Además de a primates, tales como los seres humanos, otros mamíferos diversos pueden ser tratados conforme al método del presente invento. Por ejemplo, los mamíferos que incluyen, pero no se limitan a ellos, vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, cobayas, ratas u otros animales bovinos, ovinos, equinos, felinos, roedores o especies murinas, pueden ser tratados. No obstante el método también puede  
25                   practicarse en otras especies.

## EJEMPLOS

                  Como se ha ilustrado anteriormente, las estatinas inhiben una infección de ratones SCID injertados con células mononucleares de sangre periférica humana, adultas, (PBMC; SCID.hu-PBMC), un modelo in vivo de una infección aguda por HIV. Los  
30                   resultados ilustran también que las estatinas inhiben la entrada de virus, y la salida de las células diana, atacando la geranilación de Rho. Sorprendentemente, la administración

-55-

oral de estatina durante un mes disminuye el número de copias del RNA del HIV-1 en individuos que padecen una infección crónica por HIV-1 y que no están recibiendo HAART (Tabla 1).

5 **Tabla I. Parámetros clínicos de pacientes infectados con HIV-1 y tratados con estatinas**

ID del paciente	n.º 1	n.º 2	n.º 3	n.º 4	n.º 5	n.º 6
Sexo	Macho	Macho	Hembra	Macho	Macho	Macho
Edad	53	23	33	24	42	39
Transmisión del virus	Sexual	Sexual	IVDU <sup>1</sup>	Sexual	IVDU	IVDU
Fecha del diagnóstico	1.997	2.000	1.996	ND	1.998	1.996
HAART	No	No	No	No	No	No
Coinfección con HCV <sup>2</sup>	No	No	Sí	No	Sí	No
Otros	Etilismo Pancrea- titis	Asma	Tratamien-to con metadona	NO	Tratamient o con metadona	Tratamient o con metadona
Carga viral <sup>3</sup>	antes	16.800	19.500	50.100	84.000	46.400
	después	2.330	9.940	12.138	3.590	26.300
	rebrote	16.100	56.100	64.000	26.400	32.600
CD4 (Cuentas/ml)	antes	798	520	513	760	538
	después	940	560	540	1.010	552
	rebrote	690	550	501	501	560

Estos datos proporcionan la evidencia que apoya el principio del uso de estatinas como  
10 agentes terapéuticos anti-retrovirales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Infección por HIV-1.** Se llevaron a cabo infecciones de una sola ronda con un pNL4-3.Luc.R-E, defectivo en replicación, seudotipificado con las cubiertas del HIV-1<sub>ADA</sub> o del virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Mañes, S. y col. (2000) EMBO Rep, 1, 190-196). Células MT2-CCR5 (obsequio de J. Alcamí, Inst. Salud Carlos II, Madrid, España) se trataron con lovastatina 10  $\mu$ M (48 h, 37°C) sola o mezclada con L-mevalonato (200  $\mu$ M, pirofostado de geranilgeranilo (GGPP, 5  $\mu$ M) pirofosfato de farnesilo (FPP, 5  $\mu$ M) o colesterol (5  $\mu$ M, todo ello procedente de Sigma), o con GGRT-286 (10  $\mu$ M) o FTI-277 (10  $\mu$ M, ambos procedentes de Calbiochem) antes de transducirlas con los sobrenadantes virales (multiplicidad de infección 0,1; 2 h, 37°C). La infectividad se determinó pasadas 24 h midiendo la actividad de luciferasa (Mañes, S. y col. EMBO Rep. 1, 190-196, del Real G. y col., (2002). J. Exp. Med 196, 293-301). Experimentos similares se llevaron a cabo utilizando células MT2-CCR5 que expresan Rho de tipo salvaje, marcado de GFP, Rac de tipo salvaje, o los mutantes Rho-N19 o Ra-N17 (obsequio de F.Sánchez-Madrid, Hospital de la Princesa, Madrid, España. Los ensayos de fusión célula-célula inducidos por gp160 fueron según los descritos (Mañes, S. y col. (2000) EMBO Rep, 1, 190-196).

PBMC purificadas en gradientes de Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences) se activaron durante 2 días con fitohematoglutina (PHA; 1  $\mu$ g/ml) e IL-2 (50 ng/ml), y se trataron (48 h, 37°C) con lovastatina o lovastatina + mevalonato. Las PBMC tratadas se incubaron con preparaciones virales de reserva de NL4-3 o BaL (1 ó 10 ng de antígeno p24/10<sup>6</sup> células, 3 h, 37°C). Diariamente se recogieron sobrenadantes libres de células procedentes de las células cultivadas (0,5 x 10<sup>6</sup>/ml) y se ensayaron con respecto a la presencia del antígeno p24 (Coulter).

Para la infección *ex vivo*, células PBMC se purificaron procedentes de donantes informados tratados con pravastatina (40 mg/día, 14 días, oral) antes y después del tratamiento. Ambas muestras se infectaron simultáneamente con dos dosis infecciosas de preparaciones de reserva de HIV-1. Después de lavadas, las células se sembraron en placa con PHA e IL-2, y se midió p24 a los 4 y 5 días después de la infección (Coulter).

**Modelo murino de SCDI-hu-PBMC.** Ratones CB.17 SCID/SCID, de 8-10 semanas de edad, de fenotipo no secretor, se reconstituyeron mediante una inyección i.p. de 50 x 10<sup>6</sup> PBMC humanas. Una semana más tarde, los ratones que tenían niveles



-57-

séricos comparables de inmunoglobulinas humanas, prueba de la reconstitución con células humanas, recibieron lovastatina (i.p.: 5 mg/kg) una inyección cada tres días, comenzando una semana antes de la sensibilización inmunológica con NL-4-3 de HIV (i.p.; 100 TCDI 50/ml) hasta ser sacrificados. Se midió el número de copias de RNA de HIV-1 en plasma (Amplicor HIV-1 Monitor Assay, Roche Molecular Systems) una semana después de la infección. Dos semanas después de la sensibilización inmunológica con el virus, células peritoneales ( $10^6$ ) procedentes de los ratones sacrificados se incubaron con  $2 \times 10^6$  PBMC humanas activadas con PHA, en presencia de IL-2 y se determinó p24 después de 2 semanas de co-cultivo. Las células peritoneales también se analizaron por FACS (EPICS Elite, Coulter) utilizando un anticuerpo (Ab) anti-CD5 marcado con FITC y un anticuerpo anti-CD4 unido a ficoeritrina (Pharmingen). Ratones no tratados, o ratones tratados con lovastatina se reconstituyeron con PBMC teñidas con *Cell Tracker Green CMFDA* (Molecular Probes). A los 3 y 7 días después de la reconstitución, se obtuvieron células peritoneales procedentes de dos ratones, se reunieron, y se analizaron por FACS.

**Titulación de la producción viral.** Células HEK 293T, co-transfectadas con pNL4,3.Luc.R.E. y con cDNA que codifica las cubiertas de HIV-1<sub>ADA</sub> o VSV, se trataron con lovastatina o con lovastatina + mevalonato. Se recogieron preparaciones virales de reserva pasadas 48 h y se titularon midiendo la actividad de luciferasa después de la transducción de células T HEK293 que expresan CD4. Los valores se normalizaron con respecto a la actividad de luciferasa medida en extractos de las células productoras de reserva.

**Expresión génica dirigida por LTR.** Células de Jurkat transfectadas con pLTR-luc (Schwartz, O. y col. (1990) Gene 88:197-205), con pcDNA-tat y con el plásmido que porta la luciferasa de renilla, carente de promotor, se trataron pasadas 4 h de la transfección, con inhibidores y metabolitos en las concentraciones indicadas (véase la sección correspondiente a las infecciones por HIV-1). Se calcularon las unidades relativas de luciferasa (RLU) en forma del cociente entre la actividad en luciérnaga y la actividad en renilla pasadas 48 h.

**Determinación de la masa de colesterol celular.** El contenido en colesterol de las células MT2-CCR5, no tratadas, tratadas con lovastatina o tratadas con lovastatina + mevalonato, se analizó en un cromatógrafo de gases de Hewlett-Packard

-58-

(Chropack, Middelburg. Países Bajos) según la manera descrita (Llaverías, G. y col. (2002) Eur. J. Pharmacol. 451, 11-17). La masa del éster de colessterilo se calculó restando el colessterol libre del contenido total de colessterol.

**Formación de parches inducida por gp120.** Células PBMC no  
5 estimuladas, sembradas en cámaras recubiertas con ICAM-1/Fc (*R&D Systems*) se incubaron (30 min, 12°C) con gp120 recombinante (virus X4 adaptado a una línea de células T, muestra aislada IIB; Intracel) en PBS/albúmina de suero bovino al 0,2%, seguido de anticuerpo anti-gp120 de conejo y Cy2-Ab anti-conejo (Jackson ImmunoResearch). Las células se fijaron con paraformaldehído al 3,7% en PBS en hielo,  
10 y después se incubaron por orden con anticuerpo anti-CXCR4 biotinilado (FAB1272; R&D Systems) y Cy3-estreptavidina. Por último, las células se montaron en medio de Vectashield (Vector Laboratories) y se visualizaron por microscopía confocal con láser (Leica).

**Ensayo de activación de Rho y Rac.** Células MT2-CCR5 ( $3 \times 10^6$ )  
15 tratadas con lovastatina sola o mezclada con GGPP, se sometieron a privación (3 h), y después se incubaron con preparaciones de reserva de HIV-1. A los tiempos indicados, las células se lavaron con PBS enfriado en hielo y se prepararon lisados utilizando *kits* de ensayos de activación de Rho o Rac (*Upstate Biotechnology*). Rho unida a GTP se precipitó con bolitas de agarosa unidas a RBD, y GTP-Rac se precipitó con bolitas de  
20 agarosa unidas a PBD. Rho activada o Rac activada se midieron en los sedimentos mediante transferencia Western con anticuerpos específicos, utilizando extractos celulares en crudo para la normalización. Se llevó a cabo una densitometría usando un programa *NHI Image*.

**Tratamiento con lovastatina de pacientes infectados con HIV-1.** Seis  
25 pacientes informados, infectados con HIV-1, en una etapa A1 de la enfermedad, que no habían recibido HAART, se trataron con lovastatina (40 mg/día, oral) durante un mes. Se midieron el número de copias en plasma del RNA de HIV, los recuentos de linfocitos T CD4 circulantes, y los niveles de colessterol plasmáticos, antes e inmediatamente después del tratamiento, así como a los tres meses de haber finalizado el tratamiento con  
30 lovastatina, utilizando técnicas clínicas estándar.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Las estatinas inhiben la infección por HIV-1 *in vitro* e *in vivo*

Se ha sugerido que las estatinas pueden tener efectos anti-HIV-1 (Maziere, J. y col. (1994) Biomed.Pharmacother, 48:63-67). Células PBMC humanas, activadas con PHA, pretratadas durante 48 h con lovastatina 10  $\mu$ M, se expusieron a las cepas X4(NL4-3) o R5(BaL) de HIV-1; no se observaron efectos citotóxicos a esta dosis (no mostrado). La lovastatina inhibió la repliación de HIV-1, según se indica por la reducida producción de antígeno p24 en los cultivos infectados con X4 y R5 (Fig. 5A). Este efecto se revertió mediante una co-incubación de las células con L-mevalonato, el producto de la HMG-CoA-reductasa.

Para analizar el efecto anti-HIV-1 inducido por la estatina, la susceptibilidad a una infección por el virus R5 que presentaban células PBMC procedentes de voluntarios humanos tratados con pravastatina, se comparó antes y después del tratamiento con estatina. La infectividad de PNBMC procedentes de individuos tratados con el vehículo no se afectó de manera significativa a dos dosis de HIV-1 diferentes (Fig. 5B;  $p=0,812$  para 1 ng de p24/106 células;  $p=0,218$  para 10 ng de p24/106 células, prueba de Wilcoxon Signed-Rank de dos colas). La infectividad se redujo drásticamente en las PBMC procedentes de voluntarios tratados con estatinas ( $p=0,032$  para ambas dosis del virus, prueba de Wilcoxon Signed-Rank de dos colas).

El bloqueo de la replicación de HIV-1 producido por estatinas se midió en ratones SCID injertados con PBMC humanas (SCID-hu-PBMC), un modelo de infección por HIV-1 *in vivo* (del Real, G. y col. (1998) AIDS 12, 865-872), inyectando lovastatina antes de la sensibilización inmunológica con NL4-3 de HIV-1. La carga viral media se redujo significativamente en ratones tratados con lovastatina ( $p=0,028$ , prueba de Mann-Whitney de dos colas) comparada con la de los animales tratados con vehículo (Fig. 5 C). El RNA viral fue indetectable en el plasma de 4 de los 10 ratones tratados con lovastatina; un co-cultivo de células peritoneales procedentes de dos de estos ratones, con PBMC humanas activadas por PHA, no rescató virus. Una semana después de la infección, los ratones SCID-hu-PBMC tratados con lovastatina mostraron recuentos más altos de células T CD4<sup>+</sup> que los controles; el cociente medio CD4<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup> fue del 51% en los ratones tratados con lovastatina y del 28% en los ratones tratados con vehículo (Fig. 5D), indicando una pérdida específica de células CD4<sup>+</sup> en los controles ( $p=0,048$ , prueba

-60-

de Mann-Whitney de dos colas). Para determinar si las estatinas afectaba a la viabilidad o proliferación de dos poblaciones específicas de células humanas infectadas, ratones SCID se reconstituyeron con células humanas activadas con PHA y tratadas con lovastatina igual que en el caso anterior. No se encontró diferencia en el número de células marcadas ni en la intensidad del marcaje (Fig. 5), lo que sugiere que el tratamiento con lovastatina no es deletéreo para PBMC injertadas.

### **Las estatinas afectan al ciclo replicativo de HIV-1, reduciendo la geranilgeranilación**

Una infección de una sola ronda con una variante NL4-3 de HIV-1, defectiva en la replicación, mostró que la lovastatina inhibía la entrada de variantes seudotipificadas con R5 (Fig. 6A) o X4 (no mostrado), pero no la de virus seudotipificados con la cubierta de VSV (Fig. 6A). El tratamiento con lovastatina también redujo la producción viral seudotipificada con HIV-1-X4, pero no la de los virus seudotipificados con VSV-G-, en células T HEK293 transfectadas con DNA de NL4-3.Luc defectivo en replicación (Fig. 6B). No es probable que la reducción específica inducida por lovastatina en la producción viral seudotipificada con HIV-1 sea debida a un procesamiento y síntesis diferenciales de Gag, ya que los seudotipos de HIV-1 y de VSV comparten el mismo genoma vírico. No obstante, la lovastatina aumentó la actividad promotora dirigida por LTR de HIV-1 (Fig. 6), lo que sugiere que el fármaco es capaz de regular al actividad de factores nucleares implicados en la transcripción de HIV. Estos resultados indican que la lovastatina tiene efectos pleiotrópicos sobre la replicación del HIV-1, debido a que el fármaco es capaz de promover la replicación del virus aumentando la transcripción del genoma viral, y tiene efectos anti-HIV-1 que inhiben la entrada y la salida del virus en la célula diana. Ambos efectos pro-HIV-1 y anti-HIV-1 inducidos por la lovastatina, estuvieron mediados a través de la ruta del mevalonato, ya que fueron revertidos mediante la co-incubación de las células con L-mevalonato (Fig. 6A-C).

La inhibición de la ruta del mevalonato disminuye la biosíntesis de colesterol, pero disminuye también los depósitos celulares de GGPP y FPP, ambos implicados en la modificación postraducciona de las proteínas. El solicitante ha descubierto que la inhibición de la entrada de HIV-1 en células permisivas, inducida por

-61-

lovastatina, era revertida mediante la co-adición de GGPP, pero no de FPP ni de colesterol (Fig. 7A). Esto sugiere que la lovastatina inhibe la infección por HIV-1 bloqueando la geranilgeranilación de las proteínas en lugar de previniendo la farnesilación o disminuyendo la biosíntesis de colesterol. La entrada del virus pseudotipificado con R5 fue inhibida mediante el tratamiento de las células con un inhibidor de geranilgeranil-transferasa, pero no por un inhibidor de la farnesil-transferasa (Fig. 7B); estos fármacos no afectaron la entrada de virus pseudotipificados con VSV (no mostrado). La medida del contenido del colesterol celular indicó la existencia de niveles de colesterol comparables en células tratadas y no tratadas con lovastatina; el fármaco sin embargo redujo drásticamente la masa de ésteres de colesterilo (Fig. 7C), probablemente debido a una inhibición concomitante de la acil-CoA:colesterol aciltransferasa (Kam, N. y col.,(1990) Biochem J. 272:427-433). Aunque no puede excluirse que el colesterol esterificado represente un papel en la infección por HIV-1, el descubrimiento de que el GGPP revierte la inhibición de la entrada del virus inducida por lovastatina, sugiere que los efectos de la lovastatina están mediados principalmente por la alteración de la geranilgeranilación de las proteínas. La suplementación con GGPP, pero no con FPP ni con colesterol libre, también revertió el aumento en la transcripción dirigida por LTR e inducida por lovastatina (Fig. 7 D). El tratamiento de células con un inhibidor de la geranilgeranil-transferasa aumentó también la transcripción del HIV (Fig. 7D), lo que sugiere la existencia de un mecanismo molecular general para la mediación de lovastatina sobre los efectos pro-HIV-1 y anti-HIV-1.

### **Las estatinas inhiben la agregación de receptores inducida por HIV-1, impidiendo la activación de Rho**

Para identificar la proteína(s) isoprenilada implicada en los efectos anti-HIV-1 inducidos por estatinas, se estudió el mecanismo mediante el cual la lovastatina inhibe la entrada del virus. Se analizó la formación de complejos moleculares de orden superior de gp120 con los receptores CD4 y CXCR4 de HIV-1. Células PBMC tratadas y no tratadas con lovastatina, se incubaron por orden con gp120<sub>IB</sub>, Ab anti-gp120 y Ab anti-CXCR4. Las células tratadas con lovastatina presentaron parches de gp120 de menor tamaño que las células no tratadas (Fig 8A); los parches se co-localizaron con CD4 en ambos caso (no mostrado). Aunque la lovastatina no afectó a la unión de gp120 a CD4, la

-62-

co-localización entre gp120 y CXCR4 se redujo de manera drástica en los cultivos tratados con lovastatina (Fig. 8A), lo que sugiere que la lovastatina inhibe la agregación de receptores inducida por gp120. El tamaño de los parches y la co-localización de gp120-CXCR4 fueron restituidos en las células tratadas con lovastatina mediante adición de mevalonato (Fig. 8A), pero no mediante adición de colessterol (no mostrado).

La geranilgeranilación es necesaria para la modificación lipídica postraducciona de varias proteínas ancladas en la hoja interna de la membrana, que incluyen las Rho-GTPasas (Kock, G. u col. (1997) J. Pharmacol. Exp. Ther. 283, 901-909). Además, la unión de gp120 a las células diana modifica la masa molecular de Rho y aumenta la expresión de Cdc42 (Cicala, C. y col., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 9380-9385). La incubación de las células diana con HIV-1 produjo la activación de Rho, pero no de Rac (Fig. 8B) ni de Cdc42 (no mostrado). La incubación de las células con lovastatina antes de la exposición al virus, inhibió la activación de Rho inducida por HIV-1, la cual reversionó cuando las células se co-incubaron con GGPP (Fig. 8C), lo que indica que la lovastatina impidió la activación de Rho inducida por HIV-1 mediante un mecanismo dependiente de la geranilgeranilación. La activación de Rho inducida por el virus se requiere para la entrada del virus, ya que la infección por HIV-1 pseudotipificado con R5 se redujo en células que expresan el mutante RhoN19 dominante-negativo (Fig. 8D); la expresión de RhoN19 impidió también específicamente la fusión de la cubierta de HIV-1 con la membrana de las células diana en un ensayo de fusión célula-célula (Fig. 8E). Los resultados sugieren que la lovastatina inhibe la entrada de HIV-1 en las células diana, al menos en parte, impidiendo la activación de Rho. La inhibición de Rho se ha asociado con un aumento en la transcripción de HIV-1 (Wang. L. y col., (2000) J. Immunol. 164: 5369-5374), lo que sugiere que los efectos pro-HIV-1 y anti-HIV-1 inducidos por lovastatina pueden estar mediados por Rho.

### **Las estatinas disminuyen el número de copias del RNA de HIV-1 en plasma en individuos que padecen una infección crónica**

Las estatinas se usan en el tratamiento de la lipodistrofia asociada a HAART. Tomando como base los anteriores resultados *in vitro*, se estudió el uso potencial de las estatinas para un tratamiento *in vivo* de pacientes con HIV. En un estudio preliminar realizado para probar la idea, seis pacientes infectados con HIV-1 en fase A1,

-63-

no tratados con HAART, que habían presentado una carga viral estable durante al menos seis meses (Tabla 1) se trataron con lovastatina durante un mes como única terapia. El tratamiento con estatinas en un plazo de tiempo corto indujo una clara disminución en las cargas de RNA viral en suero en todos los pacientes (Tabla I). La interrupción del  
5 tratamiento con estatinas produjo un rebrote en la carga viral (Tabla I). Los datos sugieren que las estatinas son capaces de inhibir la replicación de HIV-1 en individuos que padecen una infección crónica, y apoya el uso de las estatinas como agentes anti-retrovirales.

Las estatinas pueden tener varias células diana en el sistema inmunológico  
10 (Romano, M. y col. (2000) Lab. Invest. 80, 1095-1100); Kwak, B. y col., (2000) Nat. Med. 6, 1399-1402). El solicitante ha demostrado que la inhibición de la entrada de HIV-1 y de la producción de viriones inducidas por estatinas, así como el aumento en la transcripción viral, están mediados a través de la inhibición de la ruta metabólica del mevalonato. La entrada de HIV-1 y la gemación son procesos cooperativos que requieren  
15 la co-agregación de proteínas en la superficie de la célula hospedadora: de CD4 y de los co-receptores de quimioquinas para la entrada, de Gag y de gp160 para la gemación (Mañes, S. y col. Nat. Rev. IMMUNOL., 3, 557-568). Se ha sugerido que estos procesos están mediados por la asociación de las proteínas con las balsas lipídicas (Mañes, S. y col. (2000) EMBO Rep. 1, 190-196); Nguyen, D. y J. Hildreth (2000) J. Virol. 74, 3264-  
20 3272; Ono, A y E. Freed (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 13925-13930; del Real, G. y col. (2002) J. Exp. Med. 196, 293-301; Wang, J.-K. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 394-399); Lindwasser, O. y Resh, M. (2001) J. Virol., 75, 7913-7924; Mañes, S. y col. (2001) Semin. Immunol. 13, 147-157), y dirigidos por el citoesqueleto de actina (Iyengar, S. y col. (1998) J. Virol. 72, 5251-525; Viard, M. y col. (2002) J. Virol. 76,  
25 11584-11595; Steffens, C., y T. Hope (2003) J. Virol. 77, 4985-4991). La agregación de las balsas conlleva una reorganización del citoesqueleto de actina, para el cual algunos informes implican a Rho como efector principal (Mañes, S. y col (2003) Trend Immunol. 24, 320-326). Las estatinas son capaces de inhibir la infección por HIV-1, en parte disminuyendo la geranilgeranilación de Rho, esencial para la localización y función de  
30 Rho, que incluyen la reorganización del citoesqueleto requerida para la entrada y salida de virus.

- 64 -

En resumen, se proporciona la evidencia de que las estatinas impiden la infección por HIV-1 en células de cultivos primarios, en modelos animales, y en individuos que padecen una infección crónica. Se ha puesto de manifiesto que, a nivel celular, las estatinas inhiben la entrada y la gemación de los virus, impidiendo la geranilgeranilación de Rho, necesaria para la infección por HIV-1. Partiendo de la capacidad de las estatinas para reducir la carga viral en individuos infectados por HIV-1, se sugiere que esos compuestos presentan efectos anti-retrovirales directos y pudieran ser fármacos apropiados para un tratamiento más accesible de la pandemia del SIDA.

#### 10 INCORPORACIÓN A MODO DE REFERENCIA

Todas las publicaciones y solicitudes de Patentes citadas en esta memoria descriptiva, quedan aquí incorporadas a modo de referencia como si cada publicación individual o cada solicitud de Patente estuvieran indicadas de modo específico e individual para ser incorporadas como referencia. Más concretamente, las siguientes publicaciones se incorporan por ello en su totalidad y para todo fin:

f  
 following publications are hereby incorporated in their entirety and for all purposes: G. del  
 following publications are hereby incorporated in their entirety and for all purposes: G. del  
 following publications are hereby incorporated in their entirety and for all purposes: G. del  
 following publications are hereby incorporated in their entirety and for all purposes: G. del  
 following publications are hereby incorporated in their entirety and for all purposes: G. del  
 following publications are hereby incorporated in their entirety and for all purposes: G. del  
 A. & S. Mañes, *Specific SHP-2 partitioning in raft domains triggers integrin-mediated signaling via Rho activation*, J. Cell Biol. 157, 277-290, 2002.

Todos los contenidos y la descripción en su totalidad de la solicitud, Número 21910/001, del Expediente del Apoderado, en tramitación junto con la presente, y titulada "*Method To Screen For Chemokine Agonists And Antagonists*" se incorporan de modo específico como referencia y para todo fin.



-65-

## DECLARACIÓN DE UTILIDAD INDUSTRIAL

Con el fin de cumplir con el Tratado de Cooperación de Patentes, el presente invento declara una utilidad industrial. El presente invento proporciona medios para diagnosticar y tratar a seres humanos y a otros animales afectados con una enfermedad o estado mediado por procesos de señales a través de receptores de quimioquinas.

### REIVINDICACIONES

1. El uso de un inhibidor de la isoprenilación de proteínas o de una  
5 de sus sales, solvatos o derivados farmacéuticamente aceptables, en la fabricación  
de un medicamento para el tratamiento de una infección por HIV, de una infección  
por un retrovirus genéticamente relacionado con el HIV, o del SIDA.
2. El uso según la reivindicación 1, en el que el inhibidor de la  
isoprenilación de proteínas es un inhibidor de la geranylgeranilpirofosfato-sintetasa.
- 10 3. El uso según la reivindicación 1, en el que el inhibidor de la  
isoprenilación de proteínas es un inhibidor de la geranylgeranil-transferasa.
4. El uso según la reivindicación 1, en el que el inhibidor de la  
isoprenilación de proteínas es un inhibidor de la activación de Rho.
5. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4, en el  
15 que el inhibidor es una estatina o uno de sus análogos.
6. El uso según la reivindicación 5, en el que la estatina se  
selecciona entre el grupo que comprende lovastatina, simvastatina, pravastatina,  
mevastatina, atorvastatina y fluvastatina.
7. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6, en el  
20 que el inhibidor de la isoprenilación de proteínas está mezclado con un vehículo,  
aglutinante, agente de relleno, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables,  
o cualquiera de sus combinaciones.
8. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 7, en el  
que el inhibidor de la isoprenilación de proteínas se administra en combinación con  
25 uno o más agentes terapéuticos diferentes, seleccionados entre el grupo que  
comprende un inhibidor de la proteasa de HIV, un inhibidor de la transcriptasa  
inversa no nucleosídico, un inhibidor de la transcriptasa inversa  
nucleosídico/nucleotídico, un antagonista de CCR5, un inhibidor de la integrasa, un  
inhibidor de RNasaH, un agente inhibidor de los dominios con balsas, un agente  
30 que disminuye los niveles de colesterol, un agente que disminuye la prenilación de  
proteínas, un inhibidor de la Rho-A GTPasa, y un agente que disminuye los niveles  
de glicosfingolípidos.

- 67 -

9. El uso según la reivindicación 8, en el que dicho agente que disminuye los niveles de glicoesfingolípidos es un compuesto seleccionado entre el grupo constituido por:

D-t-3',4'-etilendioxi-1-fenil-2-palmitoilamino-3-pirrolidino-1-propanol,

5 D-t-4'-hidroxi-1-fenil-2-palmitoilamino-3-pirrolidino-1-propanol,

1-fenil-2-palmitoilamino-3-pirrolidino-1-propanol,

y sus sales y sus mezclas farmacéuticamente aceptables.

10. El uso según la reivindicación 8 ó 9, en el que dicho agente inhibidor de los dominios con balsas disocia los dominios con balsas.

10 11. El uso según la reivindicación 8 ó 9, en el que dicho agente inhibidor de los dominios con balsas inhibe la formación de dominios con balsas.

12. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones de 8 a 11, en el que dicho agente modulador de los receptores de quimioquinas inhibe la formación de los dominios de membrana con balsas y/o los disocia.

15 13. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones de 8 a 11, en el que dicho inhibidor de Rho-A GTPasa es una estatina.

14. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones de 8 a 13, en el que la combinación comprende la administración independiente, secuencial o simultánea de uno o más de los agentes.

20 15. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones de 8 a 14, en el que el uno o más agentes está mezclado con un vehículo, aglutinante, agente de relleno, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

25 16. Un inhibidor de la isoprenilación de proteínas o una de sus sales, solvatos o derivados farmacéuticamente aceptables, para usar en el tratamiento de una infección por HIV, de una infección por un retrovirus genéticamente relacionado con el HIV, o del SIDA.

30 17. Un método de tratamiento de un mamífero que padece una infección por HIV, una infección por un retrovirus genéticamente relacionado con el HIV, o SIDA, que comprende tratar a dicho mamífero con una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más agentes capaces de inhibir la isoprenilación

- 68. -

de proteínas, o de una de sus sales, solvatos, o derivados farmacéuticamente aceptables.

18. El método de la reivindicación 9, que comprende además administrar al paciente una cantidad farmacéuticamente efectiva de al menos un agente seleccionado entre el grupo constituido por un agente antiviral, un agente modulador de los receptores de quimioquinas, un agente inhibidor de los dominios con balsas, un agente que disminuye los niveles de colesterol, un agente que disminuye la prenilación de proteínas, un inhibidor de la Rho-A GTPasa, y un agente que disminuye los niveles de glicosfingolípidos.

19. El método de la reivindicación 17 o de la reivindicación 18, en el que el uno o más agentes se mezcla con un vehículo, aglutinante, agente de relleno, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en el que dicho agente antiviral es una sal de adición seleccionada entre el grupo constituido por una sal de adición de ácido, una sal de adición de metal, una sal amónica, y una sal formada con una base orgánica.

21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, en el que dicho agente que disminuye los niveles de glicosfingolípidos es un compuesto seleccionado entre el grupo constituido por:

D-t-3',4'-etilendioxi-1-fenil-2-palmitoilamino-3-pirrolidino-1-propanol,

D-t-4'-hidroxi-1-fenil-2-palmitoilamino-3-pirrolidino-1-propanol,

1-fenil-2-palmitoilamino-3-pirrolidino-1-propanol,

y sus sales y sus mezclas farmacéuticamente aceptables.

22. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, en el que dicho agente antiviral es un compuesto seleccionado entre el grupo constituido por nucleósidos, nucleótidos, inhibidores de proteasas, pirimidinonas y piridinonas.

23. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, en el que dicho agente inhibidor de los dominios con balsas disocia los dominios con balsas.

- 69 -

24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, en el que dicho agente inhibidor de los dominios con balsas inhibe la formación de los dominios con balsas.

5 25. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 24, en el que dicho agente modulador de los receptores de quimioquinas inhibe la formación de los dominios de membrana con balsas y/o los disocia.

26. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25, en el que dicho inhibidor de Rho-A GTPasa es una estatina.

10 27. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 26, en el que el método comprende además la administración independiente, secuencial o simultánea de uno o más de los agentes.

28. Un método de tratamiento de un mamífero que padece una infección por HIV, una infección por un retrovirus genéticamente relacionado con el HIV, o SIDA, previniendo la acumulación de receptores para HIV en los  
15 dominios con balsas, que comprende proporcionar un receptor para citoquinas mutante, dirigido a dominios sin balsas.

29. El método según la reivindicación 28, en el que dicho receptor mutante une a HIV pero éste no entra en los dominios con balsas.

20

1/9

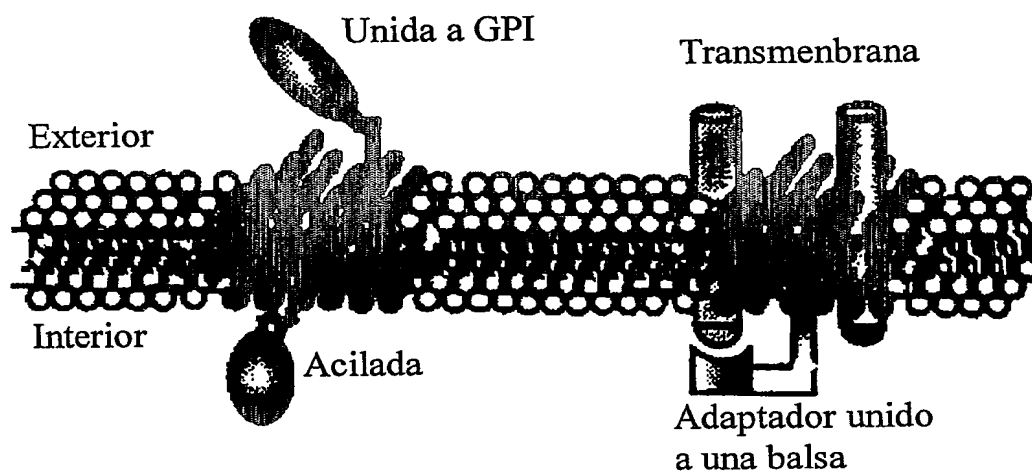


FIG. 1

2/9

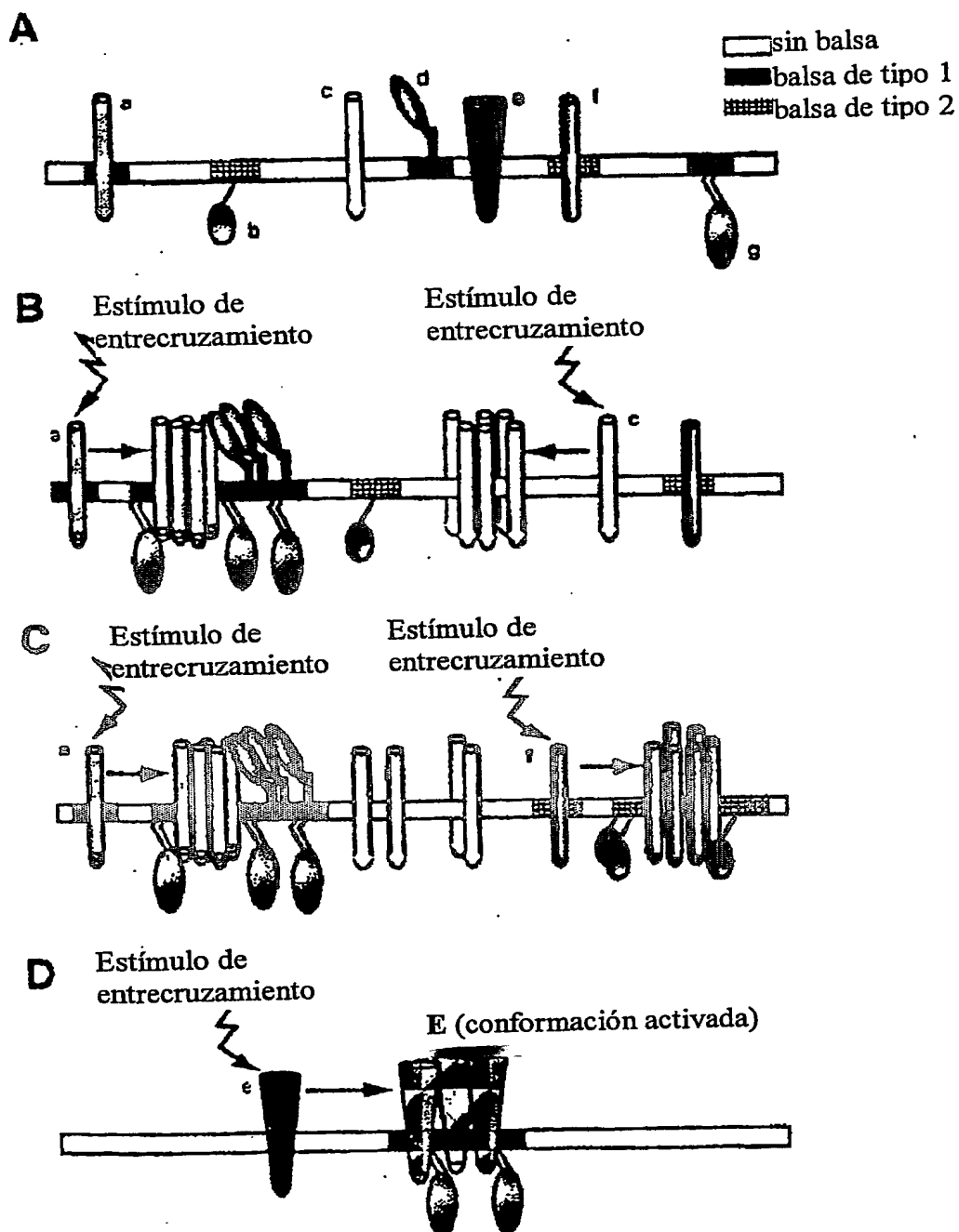


FIG. 2

3/9

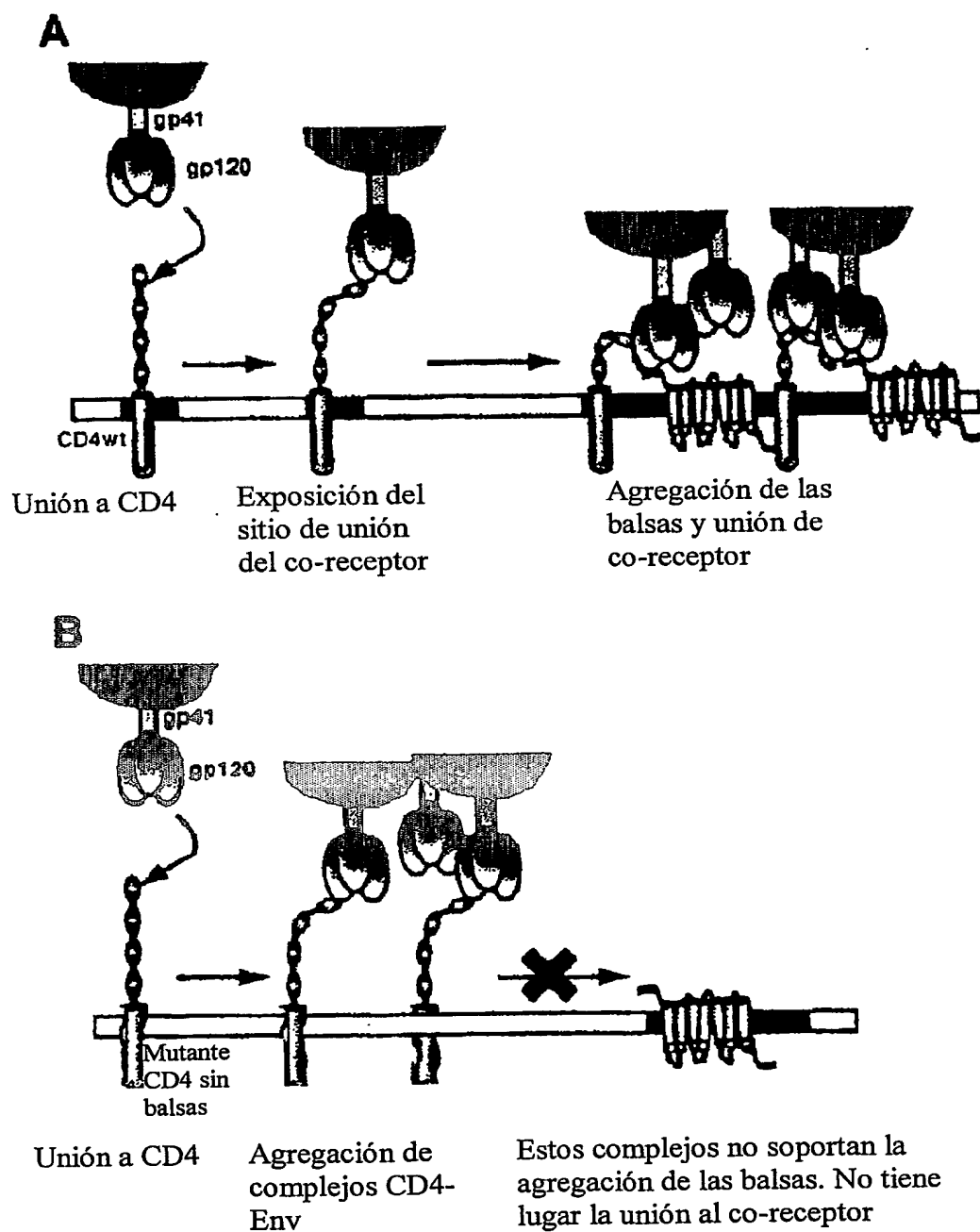


FIG. 3



4/9

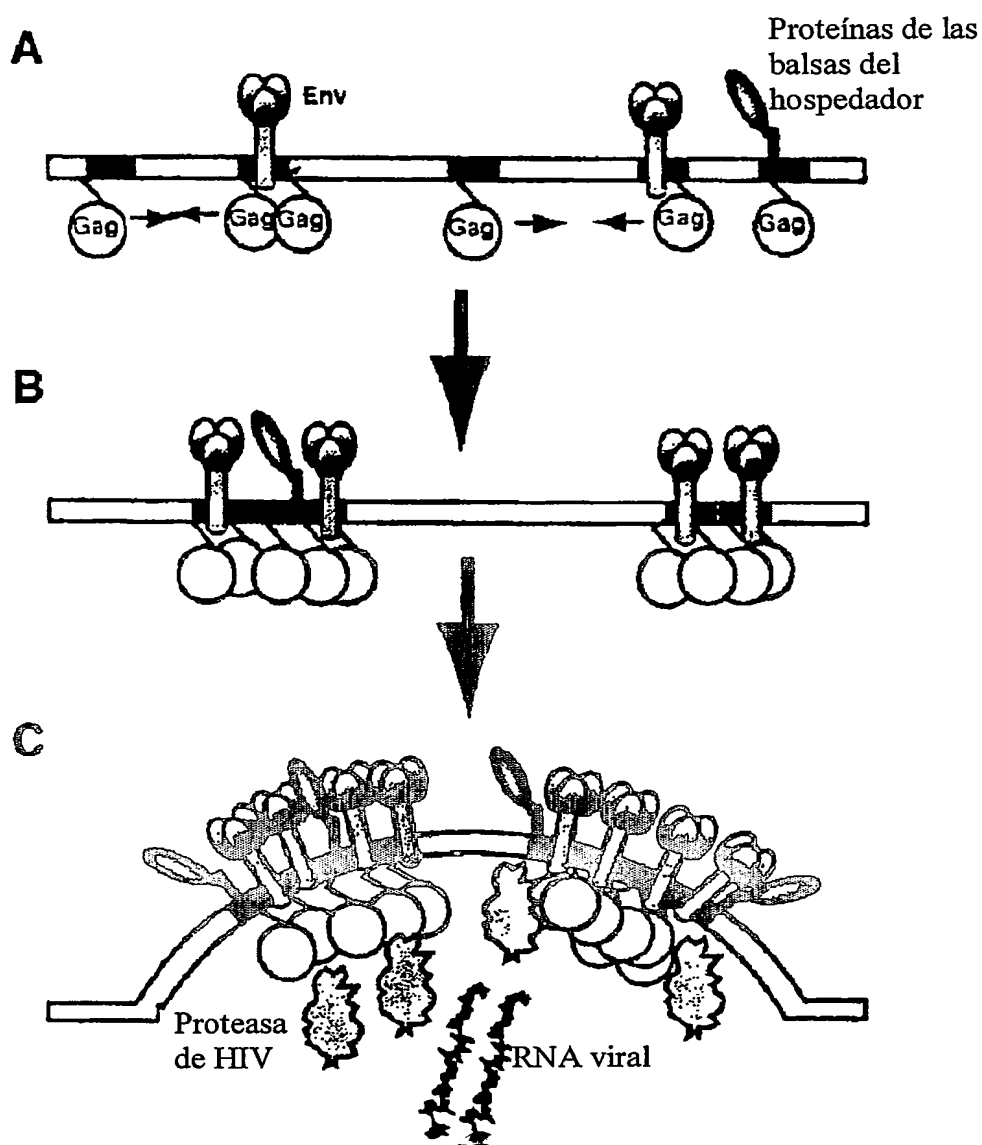
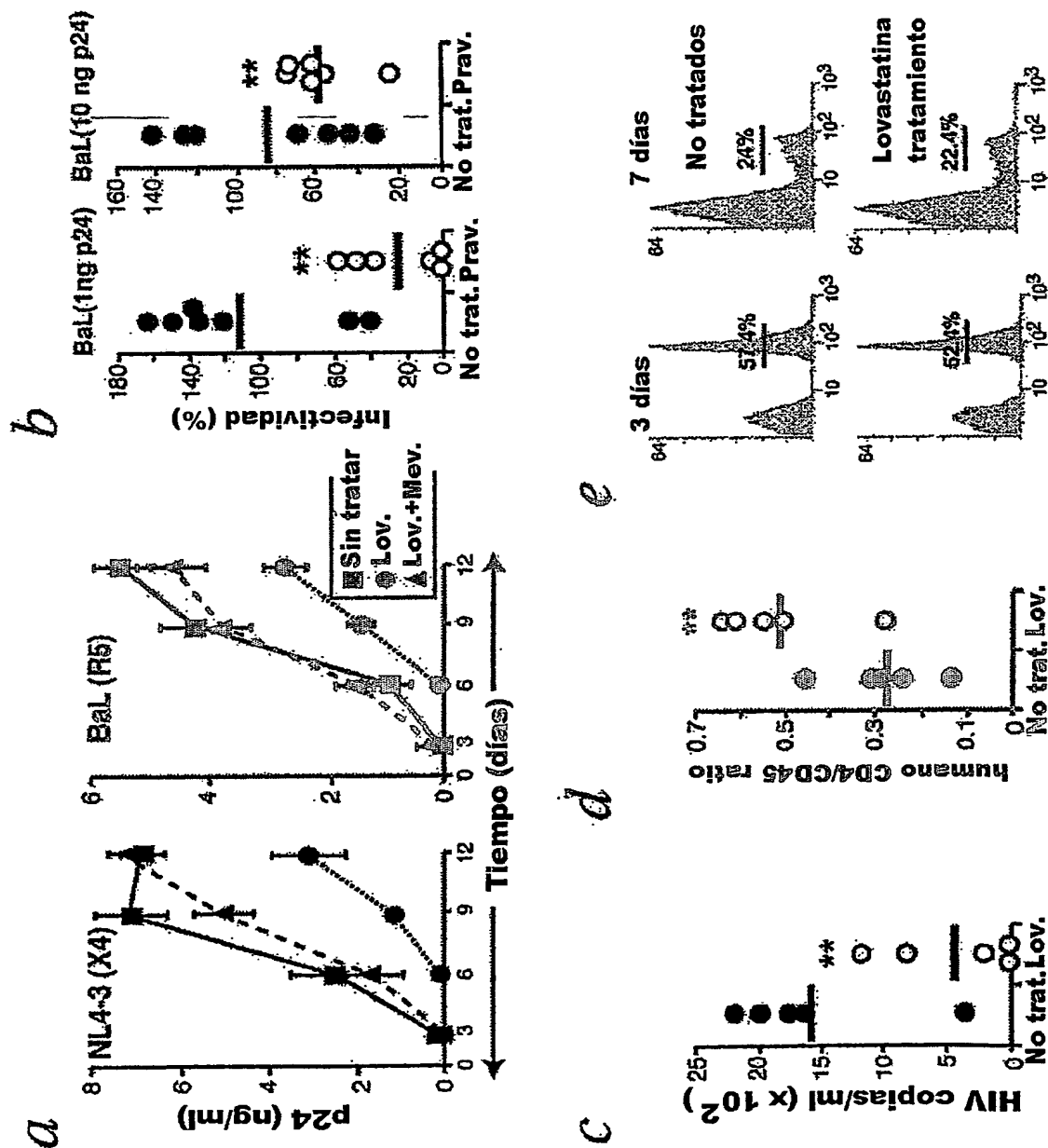


FIG. 4



Intensidad del marcaje de células

FIG. 5

6/9

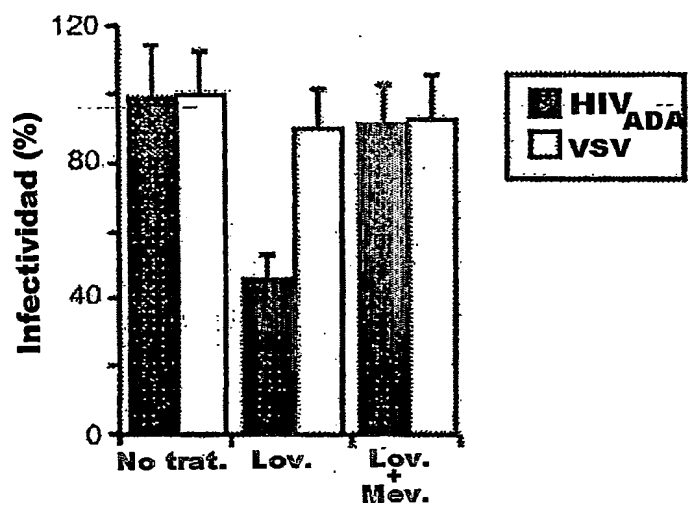
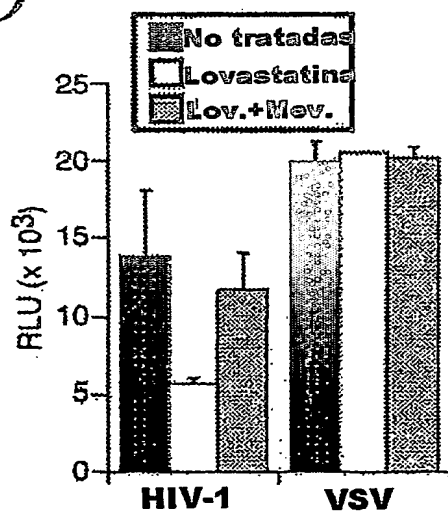
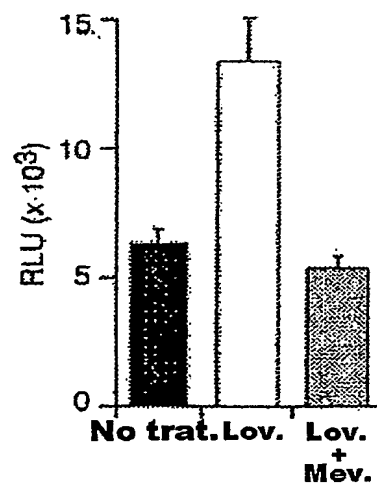
*a**b**c*

FIG. 6

7/9

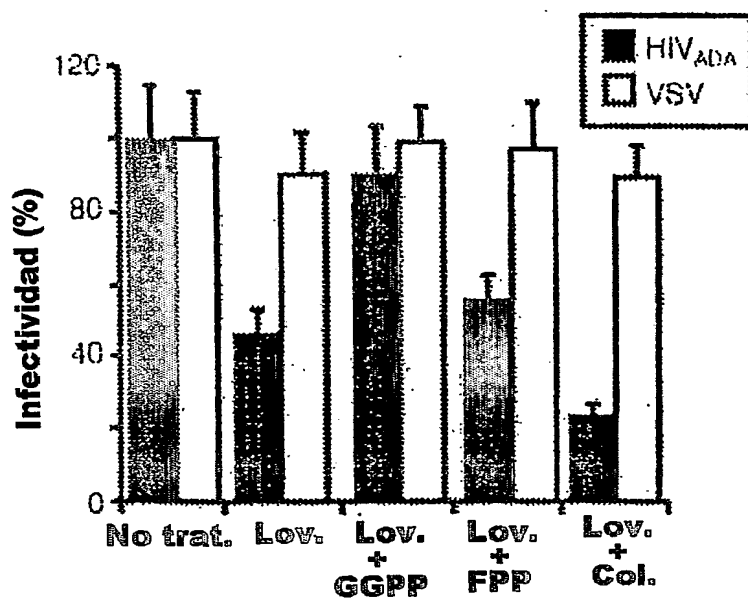
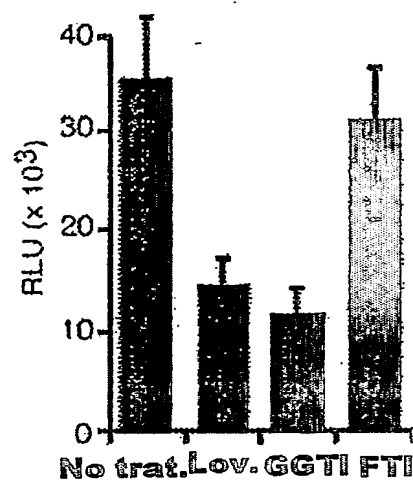
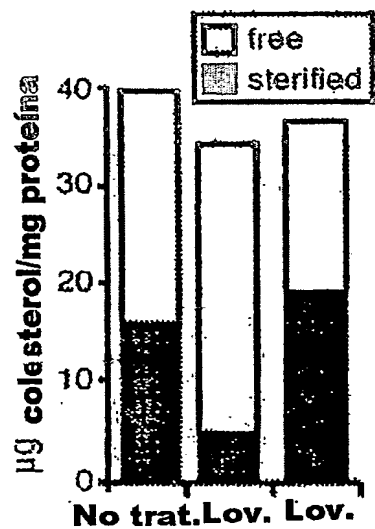
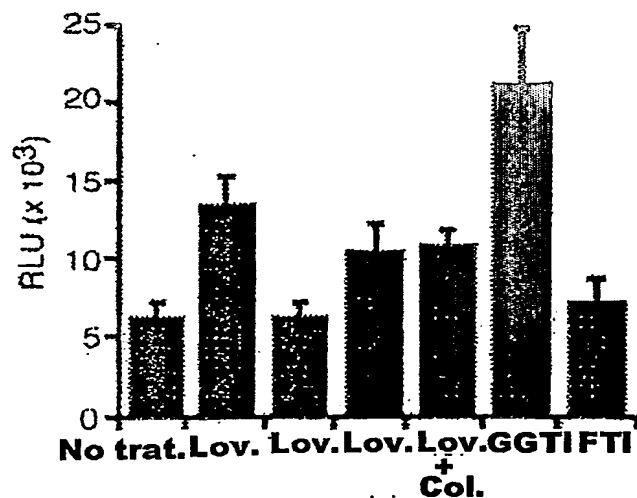
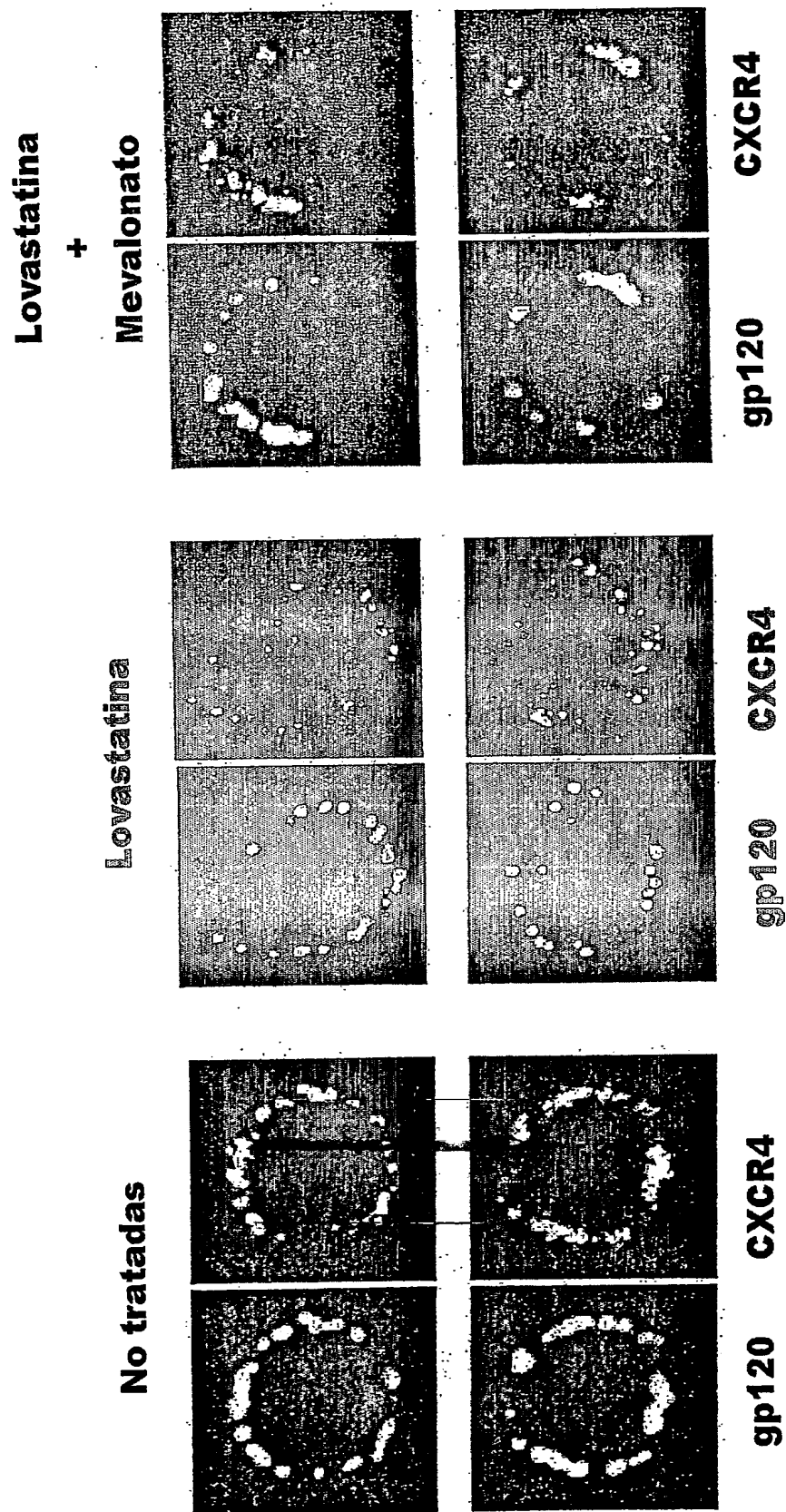
*a**b**c**d*

FIG. 7

8/9



**FIG. 8 A**

9/9

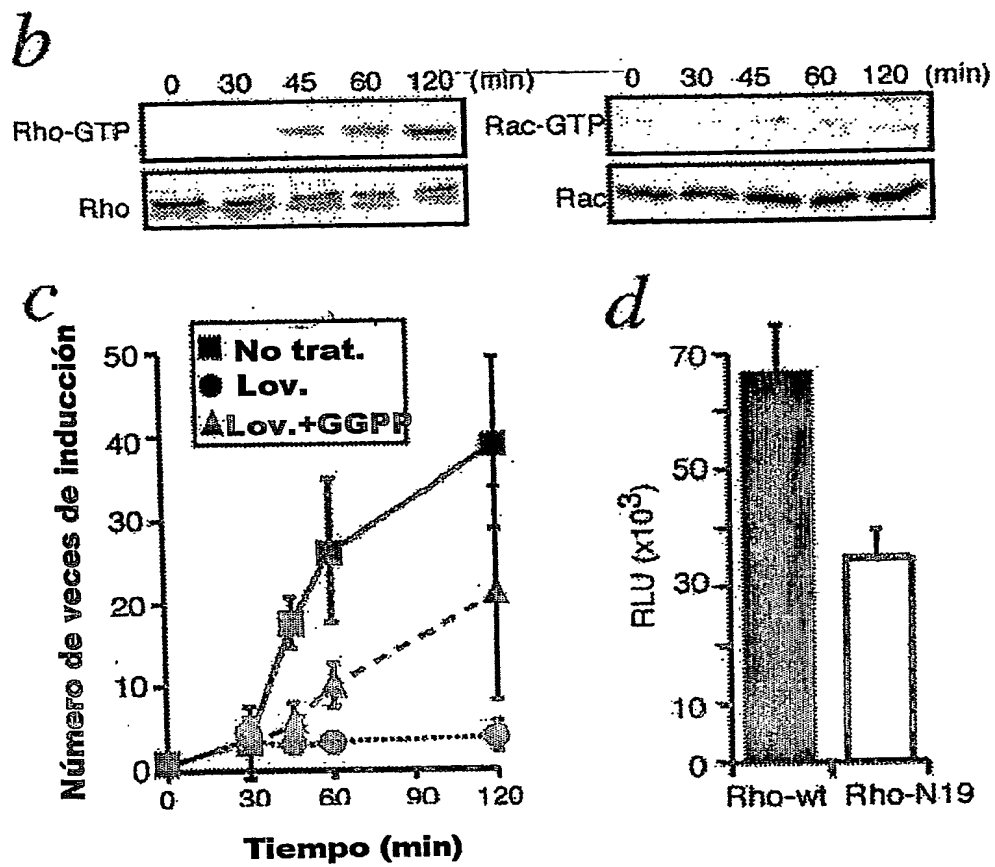


FIG. 8 B-D

## 1

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Departamento de Inmunología  
y Oncología

<110> Pharmacia Spain S.A.

<120> PREVENCIÓN DE UNA INFECCIÓN POR HIV-1 MEDIANTE INHIBICIÓN  
DE LA REORGANIZACIÓN Y/O LA ALTERACIÓN DEL CONTENIDO DE LOS  
DOMINIOS CON BALSAS DE LA MEMBRANA CELULAR, MEDICA POR Rho

<130> 21910/00010

<160> 21

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 1

gccaagctta tgaaccgggg agtc

24

<210> 2

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

2

&lt;223&gt; Secuencia artificial

&lt;400&gt; 2

agaggtaccc attggctgca ccgg

24

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Secuencia artificial

&lt;400&gt; 3

gcaacggtac cgctctgtcc attg

24

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Secuencia artificial

&lt;400&gt; 4

ctactcgagg ttcttaagcc gcc

24

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 31



3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Secuencia artificial

&lt;400&gt; 5

Gly Thr Ala Leu Ser Ile Val Leu Pro Ile Val Leu Leu Val Phe Leu

1 5 10 15

Cys Leu Gly Val Phe Leu Leu Trp Lys Asn Trp Arg Leu Lys Asn

20 25 30

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 53

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Secuencia artificial

&lt;400&gt; 6

ctgtacaagc ttaacggatc caagcttcag cggccgcacc aagctctggg cga 53

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

4

&lt;223&gt; Secuencia artificial

&lt;400&gt; 7

ctgttacagg ttcttaagcc gccagttctt

30

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Secuencia artificial

&lt;400&gt; 8

Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln

1

5

10

15

Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu

20

25

30

Trp Asn Trp Phe

35

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Secuencia artificial

5

&lt;400&gt; 9

Met Glu Arg Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser

1 5 10 15

Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu

20 25 30

Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe

35 40 45

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Secuencia artificial

&lt;400&gt; 10

Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu

1 5 10 15

Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe

20 25

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Secuencia artificial

&lt;400&gt; 11

His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln

1

5

10

15

Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe

20

25

30

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Secuencia artificial

&lt;400&gt; 12

Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn

1

5

10

15

Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp

20

25

30

Phe

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; PRT

7

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Secuencia artificial

&lt;400&gt; 13

Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu

1

5

10

15

Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp

20

25

30

Asn Trp Phe

35

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Secuencia artificial

&lt;400&gt; 14

Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn

1

5

10

15

Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu

20

25

&lt;210&gt; 15

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 15

Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln

1 5 10 15

Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu

20 25 30

Trp Asn Trp Phe Tyr Asp Pro Arg Pro Ser Ser Gly His Ser Arg Tyr

35 40 45

Ala Leu Ile Pro Ile Pro Leu Ala Val Ile Thr Thr Cys Ile Val Leu

50 55 60

Tyr Met Asn Val Leu

65

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 16

Ile Ser Tyr Glu Leu

1 5

<210> 17

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 17

Tyr Glu Leu

1

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 18

Phe Ser Tyr Glu Leu

1 5

<210> 19

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 19

Thr Val Ser Tyr Glu Leu

1                      5

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 20

Gln Val Ser Gln Asn Tyr

1                      5

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Secuencia artificial

&lt;400&gt; 21

Met Gly Cys Gly Cys Ser Ser His Pro Glu Asp Asp Ile Ser Tyr Glu

1

5

10

15

Leu